



Rôle des microARN dans la différenciation de l'épithélium respiratoire humain : caractérisation de miR-449 comme acteur central de la multiciliogenèse conservé chez les vertébrés

Benoît Chevalier

► To cite this version:

Benoît Chevalier. Rôle des microARN dans la différenciation de l'épithélium respiratoire humain : caractérisation de miR-449 comme acteur central de la multiciliogenèse conservé chez les vertébrés. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4131 . tel-01070643

HAL Id: tel-01070643

<https://theses.hal.science/tel-01070643>

Submitted on 2 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

Domaine
Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Rôle des microARN dans la différenciation de l'épithélium
respiratoire humain :**

**Caractérisation de miR-449 comme acteur central de la
multiciliogenèse conservé chez les vertébrés.**

Présentée par
Monsieur Benoit Chevalier

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2013
devant le jury composé de :

Pr Laurent COUNILLON

Pr. Pascal CHANEZ

Dr. Xavier GIDROL

Dr. Christophe BECLIN

Dr Pascal BARBRY

Dr Brice MARCET

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Sommaire

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
RESUME	10
INTRODUCTION	11
I. LES CILS	11
1. <i>Généralités</i>	11
2. <i>Le centrosome</i>	12
A. Composition et structure du centriole	14
1) Composition	14
2) Structure	14
a. Le Cartwheel	15
b. Cylindre microtubulaire	15
c. Les appendices	17
B. Multiplication des centrioles	17
1) La voie centriolaire	20
2) Voie acentriolaire	21
3) Identification des acteurs de la duplication des centrioles : les approches globales	21
3. <i>L'axonème</i>	23
A. Structure de l'axonème	23
B. Synthèse de l'axonème et poche ciliaire	25
C. Modifications post-traductionnelles des microtubules de l'axonème	27
D. Contrôle de l'expression des gènes lors de la ciliogenèse	29
4. <i>Une vision de la ciliogenèse à la lumière de l'évolution</i>	33
A. Les cils chez les eucaryotes	33
B. Les différentes hypothèses pour l'apparition des cils	33
1) Petits ARN centriolaires	35
2) Le modèle endosymbiotique (Sagan 1967)	36
3) Le modèle d'infection virale (Satir et al., 2007)	36
4) Hypothèse autogène (Pickett-Heaps, 1974)	36
C. Classification des cils	37
II. LES ORGANISMES MULTICILIES	39
1. <i>Les épithéliums multiciliés chez l'Homme</i>	41
A. Plexus choroïde et parois ventriculaires cérébrales	41
B. Les trompes de Fallope	42
2. <i>Les voies respiratoires</i>	42
A. Structure anatomique	42
B. Architecture histologique	44
C. Les muqueuses nasales	46
D. La muqueuse du pharynx	48
E. La muqueuse du larynx	48
F. La muqueuse bronchique	49
G. L'épithélium bronchiolaire	51
H. L'épithélium alvéolaire	52
1) Les pneumocytes I	52
2) Les pneumocytes II	53
I. Les différents types cellulaires de l'épithélium respiratoire des voies aériennes supérieures	53
1) Les cellules multiciliées	53
2) Les cellules basales	55
3) Les cellules sécrétrices de mucus	56

4)	Les cellules intermédiaires ou parabasales	57
5)	Les cellules canalaire	57
6)	Les cellules séreuses.....	57
7)	Les cellules myoépithéliales	58
J.	Les différentes fonctions de l'épithélium respiratoire	58
1)	Intégrité de la barrière épithéliale	59
a.	Les jonctions serrées	59
b.	Les jonctions intermédiaires.....	59
c.	Les desmosomes	61
d.	Les jonctions communicantes	61
e.	Les hémidesmosomes	61
2)	Les transports hydro-électrolytiques	61
3)	La clairance mucociliaire	63
a.	Le mucus.....	64
b.	Le liquide de surface (ASL).....	66
c.	Phase Gel	66
d.	Liquide périciliaire	68
e.	Battement ciliaire	68
f.	Modèle « Gel-on-Brush »	70
4)	Défense immunitaire de l'épithélium respiratoire	72
3.	<i>Défauts ciliaires & pathologies respiratoires (Ciliopathies)</i>	74
A.	Ciliopathies non motiles.....	74
1)	Les Dyskinésies Ciliaires Primitives.....	76
2)	La mucoviscidose.....	76
a.	Modifications du liquide de surface	78
b.	Remodelage de l'épithélium de surface	80
c.	Modèles animaux d'étude de la mucoviscidose.....	80
3)	Asthme et BPCO	81
4)	Caractéristiques de l'épithélium respiratoire chez la souris.....	82
B.	Modèles d'études de la ciliogenèse	83
1)	Le poisson zèbre (zebrafish)	83
a.	Le pronéphros	83
b.	La vésicule de Kupffer (VK)	85
c.	Les organes sensoriels	85
2)	Le xénope	86
a.	L'épiderme embryonnaire de xénope	86
b.	Néphrostomes	88
c.	Gastrocoel roof plate.....	89
III.	LES MICROARN COMME EFFECTEURS DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION DES EPITHELIUMS MULTICILIES.	90
1.	<i>Les microARN</i>	90
A.	Historique.....	90
B.	Biogenèse des miARN	91
1)	Transcription des pri-miR	91
2)	Clivage du pri-miR en pre-miR et export au noyau.	93
3)	Transport du pre-miR jusqu'au cytoplasme	93
4)	Maturation du pré-miR en miR mature.....	95
C.	Les miARN et la répression traductionnelle	96
1)	Mécanismes de répression des cibles	96
2)	La reconnaissance des cibles et la notion de « seed »	98
3)	Approches expérimentales pour l'identification des cibles.....	99
D.	MiARN et physiopathologie respiratoire.....	102
1)	Implication dans la morphologie pulmonaire	102
2)	Dérégulation des miARN dans les pathologies respiratoires.....	102
E.	La famille miR-449.....	102
1)	Localisation chromosomique et expression chez l'Homme	104
2)	Expression chez l'Homme.....	104
3)	Fonction de miR-449	106

2. Les voies de signalisation.....	107
A. La voie Notch.....	108
1) Historique.....	108
2) Mécanisme d'activation : l'activation en trans.....	108
3) Mécanismes de régulation de la voie Notch	110
a. Régulation post-traductionnelle.....	110
b. Régulation par les miARN.....	110
c. Inhibition en cis	111
d. L'inhibition latérale et les patrons de différenciation	111
4) Rôle de la voie Notch dans la différenciation des cellules multiciliées	113
B. La voie BMP.....	114
1) Voie canonique d'activation.....	114
2) La voie BMP et les voies respiratoires humaines.	114
3) La voie BMP dans l'épiderme d'embryon de Xénope.....	117
3. Polarisation des cellules multiciliées et orientation du battement ciliaire	119
A. Les Rho GTPases.....	119
1) Le réseau d'actine	119
2) Régulation de l'activité des petites GTPases	119
3) Rôle des Rho GTPases	120
4) Rôle des petites GTPases dans le tissu épithélial	122
5) Le rôle de la voie RhoA dans la ciliogénèse	122
B. La voie de la polarité planaire PCP (« Planar Cell Polarity »)	124
1) Les acteurs de la voie PCP	124
2) La voie PCP et l'orientation du battement ciliaire	124
RESULTATS	128
I. MIR-449 CONTROLE LA MULTICILIOGENESE EN REPRIMANT LA VOIE DELTA/NOTCH CHEZ LES VERTEBRES.....	131
II. MIR-449 CONTROLE LE REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE AU POLE APICAL DES CELLULES MULTICILIEES LORS DE LA MULTICILIOGENESE EN CIBLANT LA VOIE DES PETITES GTPASES.....	164
III. ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION BMP DANS LA DIFFERENCIATION DES EPITHELIUMS MULTICILIES CHEZ LES VERTEBRES	204
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	205
CONCLUSIONS	205
ANNEXES.....	205
BIBLIOGRAPHIE	205

Je tiens pour commencer à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de prendre part à l'aboutissement de ma thèse : le Professeur Laurent Counillon d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, le Professeur Pascal Chanez et le Docteur Xavier Gidrol d'avoir bien voulu être rapporteurs de mon travail de thèse ainsi que le Docteur Christophe Béclin d'en être examinateur.

Je remercie chaleureusement l'association Vaincre la Mucoviscidose d'avoir soutenu sans relâche mon travail durant ces quatre années.

Je tiens à remercier Pascal Barbry notre directeur d'institut et chef d'équipe, pour m'avoir accueilli dans son équipe au sein de son institut d'excellence il y a maintenant de nombreuses années lors de mon stage de master. Ayant aussi co-dirigé ma thèse, je tiens sincèrement à le remercier pour la confiance qu'il m'a accordé, ses conseils, sa sympathie ainsi que sa disponibilité tout au long de mon parcours de thèse. Ces qualités font que l'équipe qu'il dirige est un lieu particulier qui permet de travailler dans des conditions idéales.

Pour avoir dirigé ma thèse et m'avoir encadré, je remercie Brice Marcet qui m'a accordé une confiance de tous les instants, m'a toujours guidé et m'a transmis énormément au cours de ces quatre années aussi bien sur le plan professionnel à travers toutes ses connaissances que sur le plan personnel à travers ses expériences.

Je souhaite remercier aussi Bernard Mari, qui fut mon premier encadrant à mon arrivé dans l'équipe de Pascal Barbry et qui par sa passion pour la recherche m'a réellement conforté dans mon envie de continuer dans cette voie.

En plus de ces trois personnes de l'équipe, je remercie l'ensemble des autres membres pour leur bonne humeur, leur aide et leurs conseils. Les « filles » de la plateforme, Géraldine et Sandra de leur compréhension vis-à-vis de ma grande expérience des démarches qualité... mais aussi Virginie qui fut celle à m'avoir appris à me servir d'une pipette à mes débuts. Karine et Kévin, deux personnes qui tapent des scripts R plus vite que leur ombre. Gilles et Roger pour leur expertise dans de nombreux domaines et plus particulièrement dans le cycle cellulaire (Gilles en plus pour les réinterprétations des classiques de la chanson française). Rainer pour les discussions scientifiques et autre lors des pauses cigarette. Je remercie aussi Laure-Emmanuelle pour sa patience et ses essais d'éducation en termes de rangement... ! Mais je la remercie surtout pour son aide précieuse ainsi que ses conseils toujours très justes. Je remercie les autres doctorants/post-docs de l'équipe pour la bonne entente qui a régné entre nous, Cécile, Imène, Laura et Séb, plus particulièrement Grégoire et Olivier pour votre bonne humeur et votre motivation souvent contagieuse : vous avez presque réussi à me remettre au sport ! C'est ainsi avec une grande émotion que s'achève mon passage dans l'équipe mais surtout une grande joie et une grande fierté d'avoir pu partager quatre ans avec l'ensemble de ces personnes.

Au sein de l'institut, je tiens à remercier particulièrement la plateforme d'imagerie, Frédéric Brau et Julie Cazareth pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur professionnalisme. Frédéric Luton pour les conseils et l'aide qu'il a pu m'apporter sur la dernière partie de mon projet de thèse.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amis, Alix, Chris, Cocotte, Eliot et Hugues. Merci de m'avoir encouragé et de m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin. Un immense merci à toi Christelle, qui m'a soutenu dans les périodes de doute et a fait face à ces derniers mois intenses.

Un grand merci à mes trois sœurs, pour le bonheur et la joie qu'elles m'apportent ainsi que pour leurs encouragements et leur présence.

Enfin mes plus profonds remerciements vont à mes parents qui m'ont depuis toujours encouragé et aidé tout au long de mes études. Je les remercie infiniment de l'intérêt qu'ils ont toujours porté à ce que réalise.

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyRibonucléique
ANO3	Anoctamin 3
APC	Anaphase Promoting Complex
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
ASL	Airway Surface Liquid
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
C3GnT	core 3 beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase
Ca ⁺	ion calcium
CaCC	Calcium-Activated Chloride Channel
cAMP	cyclic Adenosine MonoPhosphate
CCDC65	Coiled-Coil Domain Containing 65
CCP	Progéniteur multicilié (Ciliated Cells Progenitor)
CD151	Cluster of Differentiation 151
CENPJ	CENtromere Protein J
Cep110	CEntrosomal Protein 110
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
ChIP	Immuno-précipitation de la Chromatine (Chromatin ImmunoPrecipitation)
CiPo	Ciliary Pocket
cnARN	ARN centriolaire
CPAP	Centrosomal P4.1-Associated Protein
CSL	Complexe protéique CBF1/Su(H)/Lag-1
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DCP	Dyskinésies Ciliaires Primaire
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
EGF	Epidermal Growth Factor

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXJ1	Forkhead Box J1
GDP	Guanosine DiPhosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GRF	Gastrocoel Roof Plate
GTP	Guanosine TriPhosphate
GWAS	Genome-Wide Association Study
HES	Hairy and Enhancer of Split
HIT-CLIP	High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation
HMGN1	High-Mobility Group Box 1
ID1	Inhibitor of DNA binding 1
IDA	Bras de dynéine interne (Inner Dynein Arm)
IFT	IntraFlagelar Transport
IL-X	Interleukine X
KIF3A	Kinesin Family Member 3A
KIF3B	Kinesin Family Member 3B
LCR	Liquide Cephalo-Rachidien
LECA	Last Eukaryotic Common Ancestor
MCC	Cellules multiciliée (MultiCiliated Cells)
miR	microARN
MPT	Modification Post Traductionnelle
MT	MicroTubules
MTOC	MicroTubules Organizer Center
MUC	MUCine
NECD	Notch Extra-Cellular Domain
NICD	Notch Intra-Cellular Domain
NLR	Node Like Receptor
ODA	Bras de dynéine externe (Outer Dynein Arm)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
Par-1	Proteinase-activated receptor 1
PAR-CLIP	PhotoActivatable-Ribonucleoside-enhanced CrossLinking and ImmunoPrecipitation
PCL	PeriCiliary Liquid
PCM	Pericentriolar Material

PCP	Planar Cell Polarity
PGDF	Platelet-Derived Growth Factor
pH	potentiel hydrogène
PKC	Protein Kinase C
PLK1	Polo-Kinase 1
PLK4	Polo-Kinase 4
pre-miR	MicroRNA précurseur
pri-miR	MicroRNA primaire
PRR	Pattern Recognition Receptor
Ran	RAs-related Nuclear protein
RFX3	Regulatory Factor X 3
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA-BP	RNA Binding Proteins
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
RPGRIP1	RPGR-Interacting Protein 1
RPRG	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
SAS-6	Spindle Assembly Abnormal Protein 6
SCC	Single Ciliated Cells
SHH	Sonic HedgeHog
siARN	small interfering RNA (siRNA)
SML	S-M Linker
STED	STimulated-Emission-Depletion
TACE	Tumor Necrosis Factor Alpha-Converting Enzyme
TF	Tissu Factor
TFF3	Trefoil Factor 3
TGFβ	transforming growth factor b
TLR	Toll Like Receptor
TNR	Transgenic Notch Reporter
TRP63	Transformation Related Protein 63
TTL	Tubulin Tyrosine Ligase
VK	Vésicule de Kuppfer
Wnt	Wingless intégration site

Liste des figures et tableaux

Figure 1	Conservation de la structure du centriole au cours de l'évolution
Figure 2	Rôle de SAS-6 dans la structure du centriole
Figure 3	Organisation des protofilaments de tubulines des microtubules A, B et C
Figure 4	Biogenèse des centrioles
Figure 5	La voie acentriolaire: les deuterosomes
Figure 6	Structure de l'axonème du cil primaire et des cils motiles
Figure 7	Transport intra-flagellaire du cil
Figure 8	Modifications post-traductionnelles retrouvées sur les dimères de tubuline alpha et beta lors de la ciliogenèse
Figure 9	Facteurs de transcription impliqués dans la formation des différents types de cils
Figure 10	Conservation et distribution des protéines du centriole et du centrosome chez les eucaryotes
Figure 11	Les cils chez l'homme et certains organismes modèles
Figure 12	Structure et développement des cellules ciliées de l'oreille interne
Figure 13	Structure des trompes de Fallope
Figure 14	Structure anatomique de l'arbre respiratoire
Figure 15	Structure anatomique des fosses nasales
Figure 16	Structure anatomique de la muqueuse bronchique
Figure 17	Les jonctions des cellules cylindriques
Figure 18	Les transports hydro-électrolytes
Figure 19	Modifications post-traductionnelles des mucines et impact de la concentration en mucines sur le gel de mucus
Figure 20	Mouvement ciliaire lors de la clairance mucociliaire
Figure 21	Nouveaux modèles de gel sur brosse (gel-on-brush)

Figure 22	Modèle de la mucoviscidose et impact sur la clairance mucociliaire
Figure 23	Les différents organes possédant des cils chez le poisson zèbre
Figure 24	Le développement embryonnaire du xénope
Figure 25	Organisation génomique des microARN
Figure 26	Biogenèse des microARN
Figure 27	Données HITS-CLIP, une vue globale des sites de fixation des microARN
Figure 28	Expression des microARN miR-449a et miR-449 chez l'homme
Figure 29	La voie de signalisation Notch
Figure 30	Détermination des patrons par la voie Notch
Figure 31	Voie de signalisation de BMP
Figure 32	L'intercalation de la couche interne lors du développement de l'épiderme
Figure 33	Mécanismes de régulation de l'activité des petites GTPases
Figure 34	La voie PCP dans les cellules multiciliées
Figure 35	Modèle récapitulatif des phénotypes observés d'après notre modèle d'action de miR-449
Figure 36	Localisation de la Filamine A et rôle potentiel avec la Meckelin
Figure 37	Impact transcriptomique du « seed » de la famille miR-34 et miR-449
Figures 38	Conservation des séquences de la famille miR-34/449
Tableau 1	Gènes régulés par FOXJ1 chez le Xénope et chez la souris
Tableau 2	Régulation des microARN dans les pathologies respiratoires

Résumé

Les cils cellulaires sont des organites anciens indispensables à de nombreux processus biologiques. Classiquement, on distingue le cil primaire, quasi-ubiquitaire et ayant essentiellement une fonction sensorielle, des cils motiles restreints à certains types cellulaires et utiles aux mouvements liquidiens ou à la locomotion. Chez les vertébrés, les cils motiles peuvent être retrouvés par centaines à la surface apicale de certaines cellules appelées cellules multiciliées (MCC). Leur battement coordonné est requis pour propulser directionnellement les fluides biologiques à l'intérieur de certains organes (voies respiratoires, ventricules cérébraux, trompes utérines ou certaines structures embryonnaires). De nombreuses pathologies humaines sont associées à des désordres des cils motiles (dyskinésies ciliaires, mucoviscidose, asthme,...).

Les voies aériennes humaines sont tapissées d'un épithélium respiratoire, constitué principalement de MCC et de cellules sécrétrices de mucus, qui joue un rôle de première ligne de défense contre les particules nocives inhalées. Ici, le battement ciliaire participe à la clairance mucociliaire qui est indispensable pour évacuer du tractus respiratoire ces particules préalablement piégées dans le mucus. Dans certaines pathologies respiratoires chroniques, des stress répétés conduisent à une réparation défectueuse de l'épithélium respiratoire, caractérisée par une perte des MCC et une augmentation anormale du nombre de cellules sécrétrices de mucus, aboutissant à une insuffisance respiratoire sévère.

Dans ce contexte, afin de mieux comprendre les mécanismes complexes intervenant dans la différenciation des MCC, mon travail de thèse s'est essentiellement focalisé sur l'étude du rôle des microARN, petits ARN non-codants régulateurs de l'expression génique, dans ce processus. A ce titre, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de différenciation de l'épithélium respiratoire humain ainsi qu'une approche *in vivo* avec l'embryon de Xénope qui a la particularité de posséder un épiderme mucocilié similaire à l'épithélium respiratoire humain.

La biogenèse des multiples cils motiles (multiciliogenèse) nécessite plusieurs événements successifs tels que l'arrêt du cycle cellulaire, le remodelage apical du cytosquelette d'actine, la multiplication, la migration et l'ancrage sous la membrane apicale de centaines de corps basaux néosynthétisés (dérivées des centrioles), structures à partir desquels l'élongation des axonèmes s'initie.

Notre travail a permis d'identifier et de caractériser la famille de miARN miR-449 comme spécifiquement exprimée dans les MCC et jouant un rôle clé dans la multiciliogenèse dans nos deux modèles d'étude. Mon travail a particulièrement consisté à élucider les mécanismes moléculaires et signalétiques mis en jeu dans ce processus. Nous avons montré que miR-449 bloque le cycle cellulaire, et réprime directement la voie de signalisation Notch ainsi que l'expression de la petite GTPase R-Ras, trois événements nécessaires au déclenchement de la différenciation des MCC. Nous avons aussi souligné que l'inhibition de la voie BMP est requise pour l'inhibition de la voie Notch, et dont miR-449 pourrait agir en tant que connecteur central de ces deux voies de signalisation au cours de la multiciliogenèse. De manière importante, nous avons démontré que l'ensemble de ces mécanismes est conservé au cours de l'évolution du Xénope à l'Homme.

Ainsi, nos travaux placent miR-449 comme chef d'orchestre de la multiciliogenèse conservée chez les vertébrés et ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des petits ARN régulateurs dans le traitement de pathologies associées à des défauts des cils motiles.

Introduction

Préambule

Au cours de ma thèse j'ai étudié les mécanismes régulant la formation des cils motiles, organites indispensables dans la clairance mucociliaire et dans la défense des voies respiratoires. Au-delà de cette fonction, une vision plus large de l'importance des cils motiles peut être dégagée en se plaçant d'un point de vue de l'évolution. C'est cet aspect que nous avons voulu mettre en exergue dans l'ensemble de nos travaux. L'apparition des cils cellulaires au cours de l'évolution est un événement ancestral caractéristique des cellules eucaryotes. Dans une première partie de mon introduction, je montrerai au travers de la description structurale des cils ainsi que leur régulation, la conservation forte de nombreux acteurs indispensables à leur élaboration au fil de l'évolution. Il est remarquable d'observer comment différents organismes ont pu modeler et décliner sous diverses formes ces cils cellulaires afin de les adapter à des fonctions biologiques distinctes. Pour souligner cet aspect, j'aborderai dans la deuxième partie la description des différents types cils observés chez certains organismes dont l'Homme, et chez qui des défauts ciliaires aboutissent à de nombreuses pathologies. Enfin, une dernière partie dressera l'état des connaissances sur les voies de signalisation majeures impliquées dans la formation des cils motiles, au sein desquelles les microARN figurent comme nouveaux régulateurs centraux.

I. Les cils

1. Généralités

Cette introduction portera exclusivement sur les cils et flagelles présents chez les organismes eucaryotes, même si les organismes procaryotes possèdent des organelles similaires. Ces dernières sont en effet structuralement et fonctionnellement très différentes.

Les cils retrouvés dans les organismes eucaryotes se projettent comme des antennes à partir du corps de la cellule. Leur première observation au microscope daterait d'Antoni van Leeuwenhoek en personne qui, à la fin du 17^{ième} siècle, identifia le mouvement d'un protozoaire généré par son cil motile. La fonction du cil a longtemps été restreinte à cette unique fonction de motilité. Ce n'est qu'en 1968 que l'équipe de Sorokin identifia des cils primaires dépourvus de motilité (Sorokin, 1968). L'étude des fonctions cellulaires et moléculaires des cils n'a suscité que peu d'intérêt jusqu'à ce que soient mises en évidence durant les deux dernières décennies leurs nombreux rôles dans divers processus

biologiques comme la transduction de signaux, les détections chimio- et mécano-sensorielles ou l'établissement de la polarité et de l'asymétrie droite/gauche au cours du développement embryonnaire (cf. partie II. 3. A. 1)). Chez les eucaryotes, certaines cellules arborent à leur surface apicale jusqu'à plusieurs centaines de cils motiles nécessaires à la locomotion et à la propulsion de fluides biologiques. Ces cellules dites multiciliées sont retrouvées depuis des protozoaires comme la paramécie ou *chlamydomonas* (Adair, 1985), jusqu'aux métazoaires comme les planaires ainsi que chez tous les vertébrés. Chez les vertébrés, une typologie complexe des cils doit être élaborée, qui va dépendre de leur nombre, de leur mobilité, de la localisation tissulaire des cellules où ils sont détectés, de leur structure moléculaire spécifique. Alors que le spermatozoïde possède un flagelle locomoteur, équivalent à un cil motile unique de grande taille, des cellules multiciliées sont détectées aussi bien dans le tissu respiratoire, les trompes de Fallope, ou les ventricules cérébraux. Dans tous ces tissus, elles jouent un rôle essentiel dans la dynamique des fluides biologiques. Des défauts structuraux ou fonctionnels de ces cils ont été associés à de nombreuses pathologies humaines dont certaines sont regroupées sous le terme de dyskinésies ciliaires.

La première caractéristique des cils est la présence à sa base d'un centrosome, qui est le principal centre organisateur de microtubules (MTOC) de la cellule et ceci même en l'absence de cils.

2. Le centrosome

On distingue centrosome et corps basal selon l'étape du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule. Lorsqu'elle se divise, on parle du « centrosome », alors que dans une cellule quiescente on parle de corps basal.

L'existence, la composition et même la fonction du centrosome ont été l'objet de nombreux débats. Certains de ces débats sont encore d'actualité comme par exemple la présence d'acides nucléiques au sein de cette organelle (cf. partie I. 4. B. 1)). La première description des centrosomes date de la fin du 19^{ième} siècle grâce au développement d'une microscopie optique plus performante associée à l'apparition de techniques de fixation et de coloration des échantillons. De façon indépendante, Walther Flemming (1875) et Édouard van Beneden (1876) décrivent pour la première fois des « corpuscules polaires » rattachés aux chromosomes. Leur observation révélera plus tard le rôle du MTOC pour la séparation des chromatides sœurs lors de la mitose. Le terme de centrosomes ne fait réellement son apparition qu'en 1888 avec Theodore Boveri. Boveri fut le premier à émettre en 1914 l'hypothèse visionnaire du rôle des centrosomes dans la stabilité chromosomique et de leur implication dans les cancers.

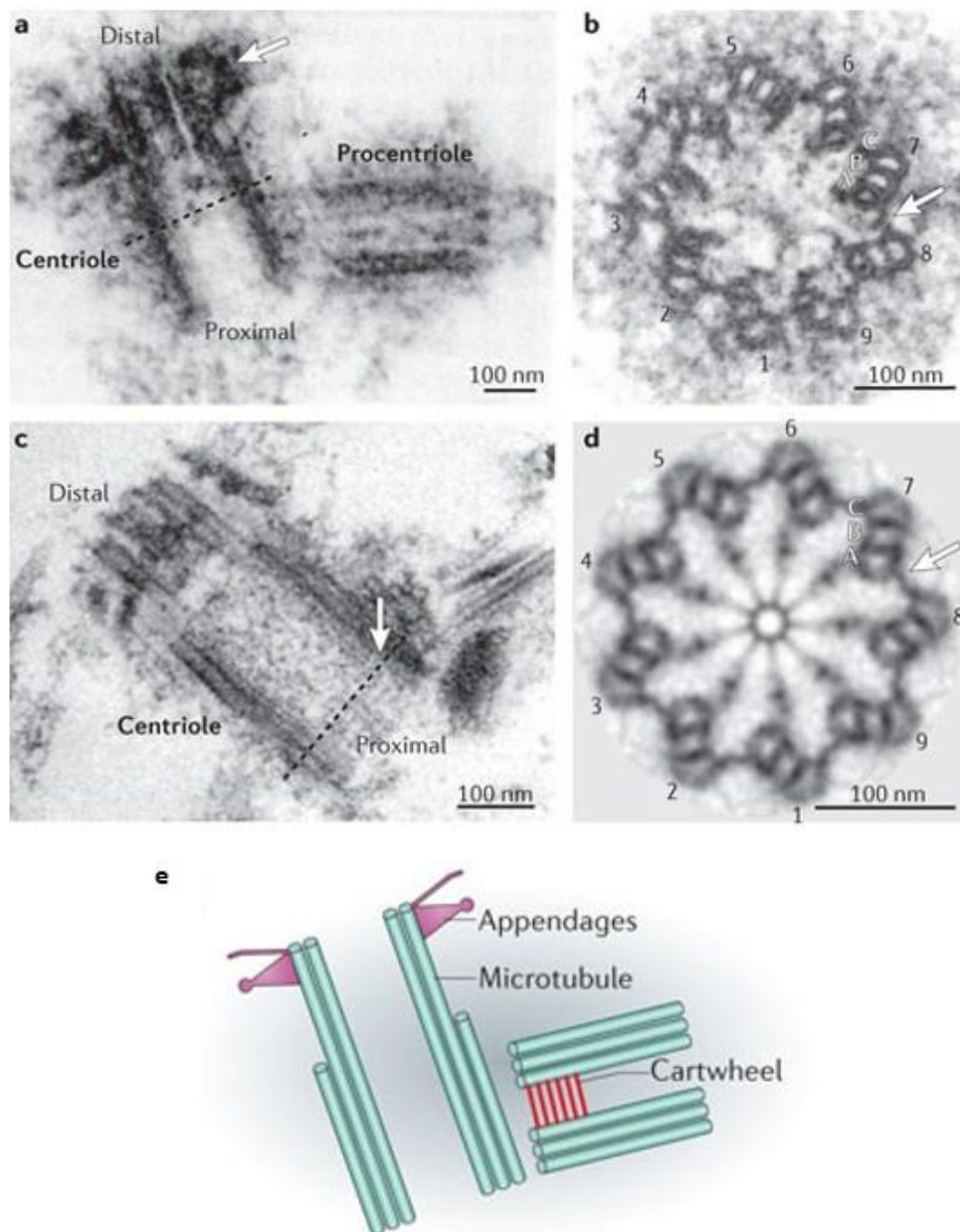


Figure 1: Conservation de la structure du centriole au cours de l'évolution (d'après Gönczy et al., 2012)

Ultrastructure d'un centriole et d'un procentriole purifié à partir de cellules humaines (a. et b.) ou de *Chlamydomonas reinhardtii* (c. et d.)

- Vue de côté d'un centriole et d'un procentriole en microscopie électronique. Sur l'image sont représentées la partie distale et proximale du centriole père. La flèche indique une zone dense en électrons et correspondant aux appendices distales et sub-distales. La ligne en pointillée désigne la coupe observé en b.
- Une représentation en section de coupe de la partie proximale d'un centriole. La symétrie radiale d'ordre 9 est indiquée par la présence des 9 triplets de microtubules (MTA, MTB et MTC) numérotés de 1 à 9. La flèche indique un lien entre deux triplets de microtubules. Le lien rejoint le MTA d'un triplet au MTC d'un triplet voisin.
- Microscopie électronique d'un centriole avec annotées la partie distale et proximale. La flèche indique la partie proximale du cartwheel.
- Vue en coupe de la partie proximale (représentative des pointillés indiqués en c.) avec la symétrie d'ordre 9. Un triplet de MT est composé des 3 MT notés A, B et C pour les MTA, MTB et MTC respectivement. Les 9 triplets de MT sont numérotés de 1 à 9. La flèche indique un lien entre deux triplets de microtubules.

L'amélioration constante des technologies d'imagerie, combinée au développement d'approches de biologie à haut débit (criblages de banques de siARN, analyses protéomiques, analyse de protéines marquées par des approches de vidéo-microscopie,...) ont accru considérablement nos connaissances sur le centrosome et le corps basal, ainsi que sur leur entité centrale, le centriole.

Dans les cellules animales, le centrosome agit comme le principal MTOC au sein de la cellule. Il est composé d'un centriole père entouré de son matériel péricentriolaire (PCM) et d'un centriole fils. Il joue un rôle primordial dans l'assemblage du fuseau mitotique lors de la séparation des chromatides sœurs au moment de la mitose. Dans les cellules quiescentes et dans certaines cellules différenciées, le centrosome sert de base pour l'ancrage de l'axonème des cils. La duplication du centrosome est liée à la progression du cycle cellulaire mais dans certains types cellulaires on assiste à une multiplication de plusieurs centaines de centrioles (ex : cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire).

Au cours de ce chapitre, nous aborderons la multiplication des centrioles, leur composition, leur structure et plus largement la composition du centrosome, ses interactions et son rôle biologique.

A. Composition et structure du centriole

1) Composition

La composition moléculaire des centrosomes, des centrioles et des corps basaux varie en fonction du cycle cellulaire. Cette composition a été longtemps rendue difficile à étudier du fait de la faible quantité de matériel accessible, et de la difficulté technique liée à leur purification (Bornens et al., 1987). A partir de nombreuses études, 14 protéines entrant dans la composition du noyau central des centrioles ont été identifiées (Hodges et al., 2010).

2) Structure

Le développement de la microscopie électronique dans les années 1950 a permis une observation précise des centrioles et une meilleure caractérisation de leur structure. Dans les cellules humaines, un centriole mature a une forme cylindrique d'environ 400 nm de hauteur et des diamètres interne et externe d'environ 130nm et 250 nm, respectivement (Kitagawa et al., 2011). Chez les vertébrés la hauteur du cylindre est relativement stable, mais peut grandement varier chez certaines espèces : chez la drosophile, par exemple, entre 175 et 700 nm en fonction du développement embryonnaire et du type cellulaire (Moritz et al., 1995).

Le centriole est caractérisé par (Li et al., 2012): le cartwheel (« roue de voiture ») qui sert d'échafaudage pour l'ensemble du centriole, le cylindre microtubulaire, qui comporte une partie

distale et une partie proximale, et les appendices du centriole père mature, qui jouent un rôle d'ancrage des microtubules (notés MT) cytoplasmiques (cf. figure 1).

a. Le Cartwheel

La base de chaque centriole possède une structure en échafaudage appelée « cartwheel ». La protéine SAS-6 (*Bld12p* chez *C. Reinhardtii*) a été montrée comme partie intégrante de ce cartwheel (Nakazawa et al., 2007). Récemment, la résolution de la structure cristallographique des domaines de SAS-6 a indiqué que des polymères de SAS-6 s'organiseraient en tubules centraux avec une symétrie d'ordre 9: des complexes dimériques de SAS-6 s'auto-assembleraient, chaque dimère étant séparé de ses deux plus proches voisins par un angle d'environ 40°. L'assemblage des 9 dimères, correspondant à 18 unités de SAS-6, induirait ainsi la formation du foyer central (le « Hub ») et des rayons ou structures radiales (les « radial spokes ») (cf. figure 2) (Kitagawa et al., 2011; van Breugel et al., 2011). La symétrie radiale d'ordre 9 du cartwheel permet ainsi de rendre compte de la structure bien particulière des MT au cœur du cylindre.

b. Cylindre microtubulaire

Le cylindre microtubulaire possède une extrémité proximale orientée vers l'intérieur de la cellule dont le rôle principal concerne la maturation et l'assemblage du procentriole (Strnad and Gonczy, 2008). L'extrémité proximale possède 9 triplets de MT (région en triplets), dénotés MTA, MTB et MTC (cf. figure 3). Chaque MT est composé de dimères de tubuline alpha et de tubuline bêta liées par des liaisons non covalentes. La concaténation de 13 dimères de protofilaments de tubulines alpha/bêta constitue le MTA avec son extrémité (-) au niveau proximal et son extrémité (+) au niveau distal. Les MTB et MTC sont quant à eux formés de 10 proto-filaments organisés en forme d'arcs qui s'appuient sur chacun des MT inférieurs (MTB s'appuyant sur MTA, et MTC sur MTB) (Li et al., 2012). Les MT interagissent également avec le « cartwheel », via une tête d'épingle (« pinhead ») composé par CEP135 (*bld10* chez *Chlamydomonas*) (Nakazawa et al., 2007), une protéine qui co-immunoprécipite avec SAS-6. Chaque MTA d'un triplet est rattaché au MTC du triplet voisin (dans le sens horaire) grâce à un « linker » entre MTA et MTC.

L'extrémité distale du cylindre microtubulaire est orientée vers l'extérieur de la cellule, étant rattaché directement à l'axonème des cils dans les cellules quiescentes. L'extrémité distale possède uniquement des doublets de MTA et MTB. La liaison entre doublets s'effectue via un « linker » entre le MTA d'un doublet et le MTB d'un doublet voisin (Li et al., 2012).

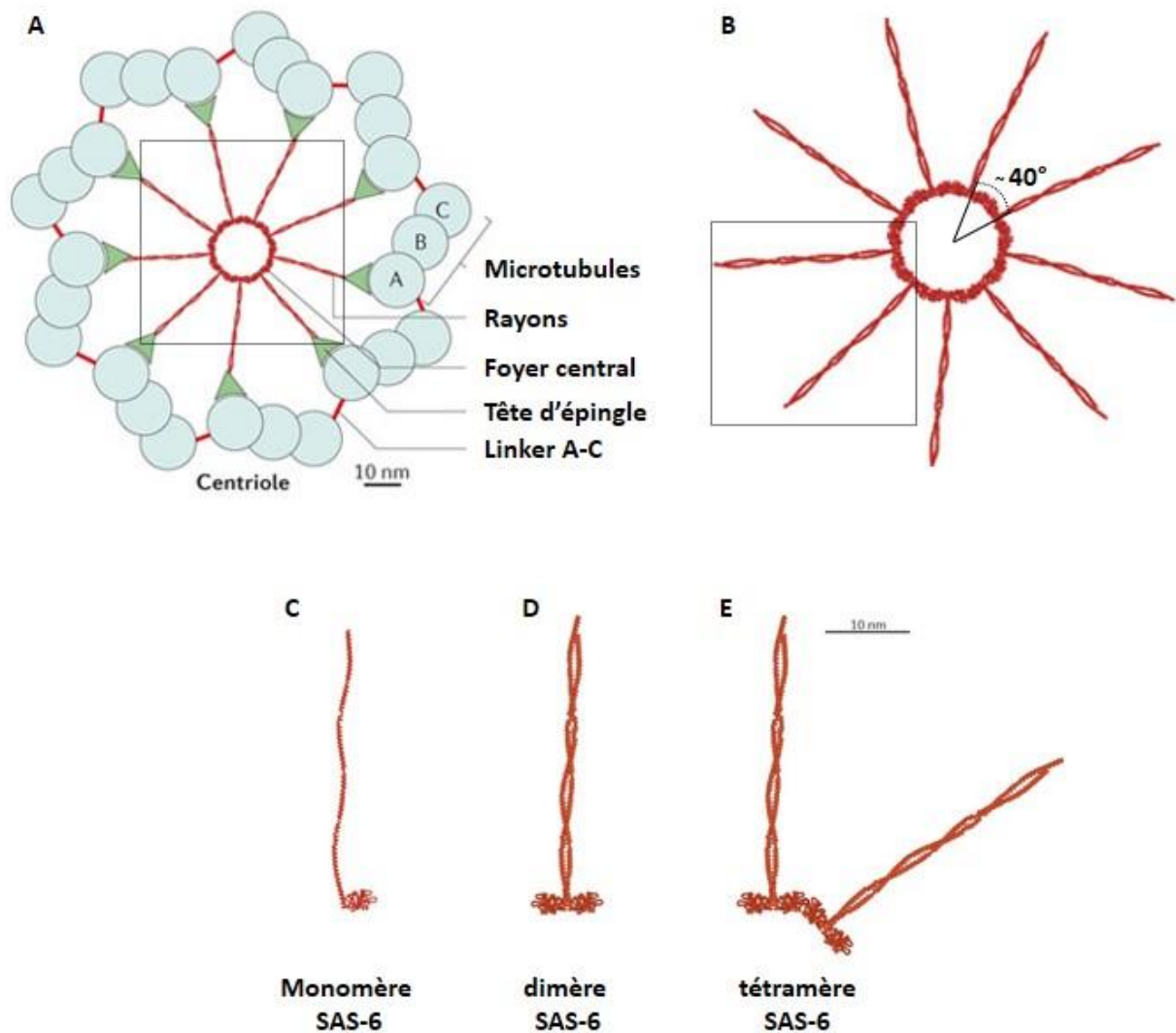


Figure 2: Rôle de SAS-6 dans la structure du centriole (adapté de Gönczy et al., 2012)

A - Représentation schématique d'un centriole. Le cartwheel est caractérisé par un foyer centrale d'environ 20nm de diamètre, à partir duquel émane les rayons reliés aux MTA par les têtes d'épingle.

B - Représentation du foyer central et des rayons composés de 9 dimères de SAS-6 donnant la symétrie d'ordre 9 du centriole. Comme indiqué l'angle entre deux rayons est d'environ 40°.

C - L'unité de base du cartwheel est un monomère de SAS-6.

D - Les monomère de SAS-6 se dimérisent formant ainsi un rayon du cartwheel.

E - Les dimères de SAS-6 s'auto-assemblent en formant un angle d'environ 40°. L'assemblage de 9 dimères de SAS-6 forment la base du cartwheel et induisent la symétrie d'ordre 9 caractéristique du centriole.

En règle générale, les MT subissent de façon continue des cycles de polymérisation/dépolymérisation. Il convient toutefois de noter que, d'après des expériences menées avec des tubulines biotinylées, les échanges entre les pools de tubulines cytoplasmiques et de tubulines centriolaires sont faibles, ce qui indique une certaine stabilité de l'association des MT présents dans les centrioles (Kochanski and Borisy, 1990). Cette stabilité peut être expliquée par des modifications post-traductionnelles (cf. partie I. 3. C), ainsi par la présence de protéines stabilisatrices dans la lumière centriolaire, comme cela a été proposé récemment après établissement de la carte 3D des triplets de MT des centrioles chez *C. reinhardtii* (Li et al., 2012). D'autres expériences menées également par cryotomographie électronique sur des cellules humaines par Guichard et collaborateurs ont montré qu'un domaine stabilisateur « γ -Turc-like », présent à la base du MTA, permettait une stabilisation de l'extrémité par « capping » et une élongation directionnelle des MT (Guichard et al., 2010). Chez *C. elegans* la déplétion en γ -tubuline induit des défauts d'organisation et d'élongation des MT, indiquant un rôle soit dans la stabilisation des MT ou dans le recrutement de protéines nécessaires à la formation du procentriole (O'Toole et al., 2012).

c. Les appendices

Lors de sa maturation, chaque centriole fils acquiert des appendices pour devenir un centriole père, qui sont retrouvés au niveau sub-distal ou distal du centriole. En dépit de l'identification de nombreux acteurs impliqués dans la formation de ces appendices, leur mode précis d'assemblage reste encore peu caractérisé. Alors que les appendices sub-distaux jouent un rôle d'organisation des MT, les appendices distaux sont nécessaires pour le recrutement des corps basaux à la membrane lors de la ciliogénèse (Anderson, 1972).

B. Multiplication des centrioles

Les centrosomes sont essentiels lors du développement embryonnaire. Cependant, il a été possible de maintenir le cycle cellulaire, le développement embryonnaire précoce chez la souris ainsi que des stades tardifs du développement chez la drosophile en l'absence de centrosomes (Basto et al., 2006; Calarco-Gillam et al., 1983). Ces observations soulèvent une question fondamentale qui est de savoir l'importance exacte du centrosome dans le développement et le destin cellulaire.

La multiplication des centrioles passerait par deux voies possibles : (1) une voie centriolaire où les centrioles se dupliquent à partir de centrioles préexistants ; (2) une voie acentriolaire où les centrioles se formeraient *de novo*. Ces deux voies pourraient coexister au sein d'une même cellule (Sorokin, 1968). De plus, l'activation d'une voie acentriolaire a pu être mise en évidence dans des cellules

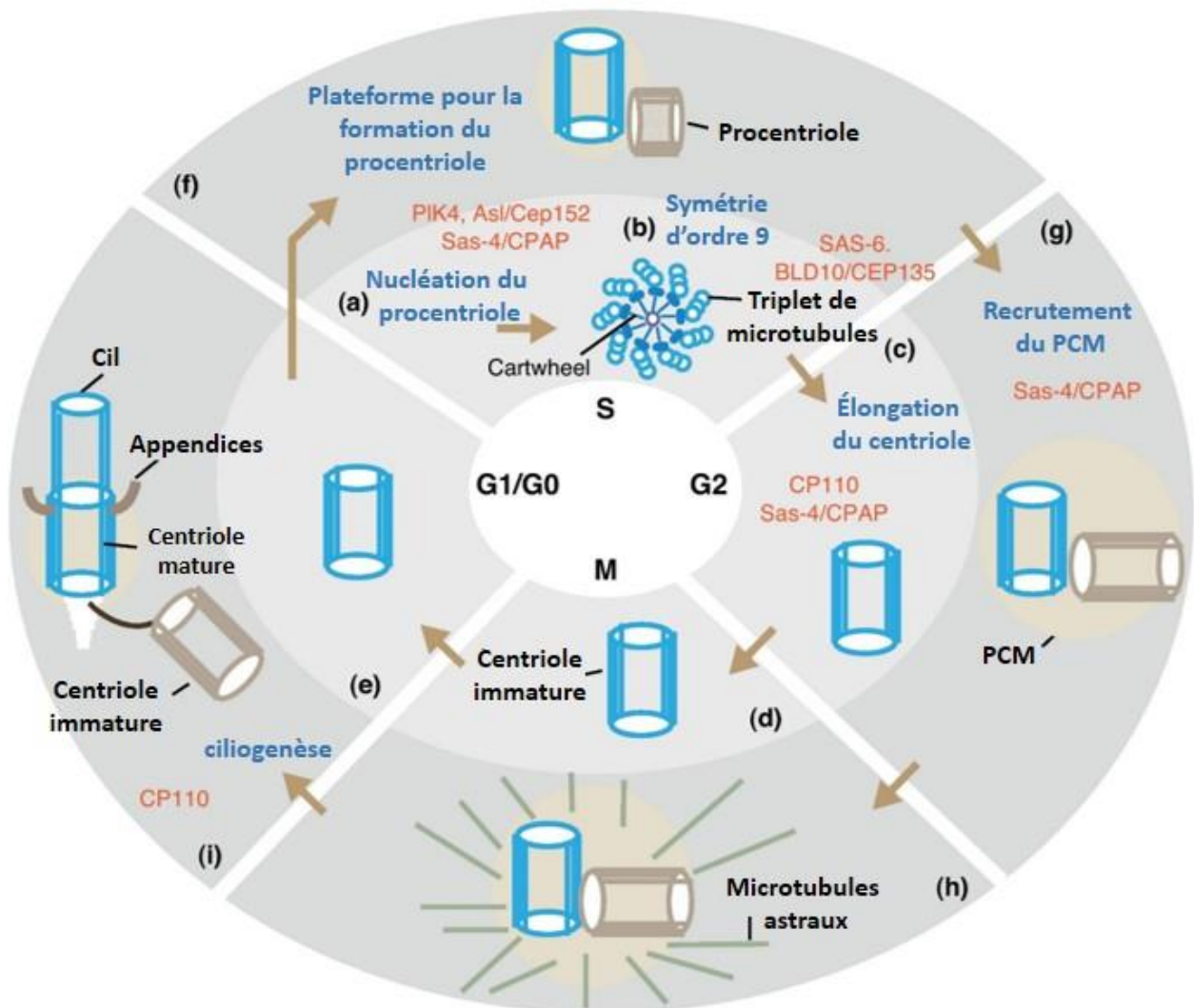


Figure 4: Biogenèse des centrioles (adapté de Avidor-Reiss et al., 2012)

Représentation de la voie centriolaire avec le cycle cellulaire. La formation d'un nouveau centriole (indiqué en bleu) au cours de deux cycles cellulaires consécutifs. Lors du premier cycle cellulaire (noté de (a) à (e) sur fond gris clair) la structure de base du nouveau centriole est formée, il est alors appelé centriole immature. Lors du second cycle cellulaire (noté de (f) à (i), sur fond gris foncé), le centriole immature acquiert différentes structures et fonctions pour devenir un centriole mature (i). Au cours du second cycle, un nouveau centriole est créé, appelé procentriole (en marron clair). L'ensemble des protéines clé intervenant au cours des différentes étapes (notées en bleu foncée) sont marquées en orange.

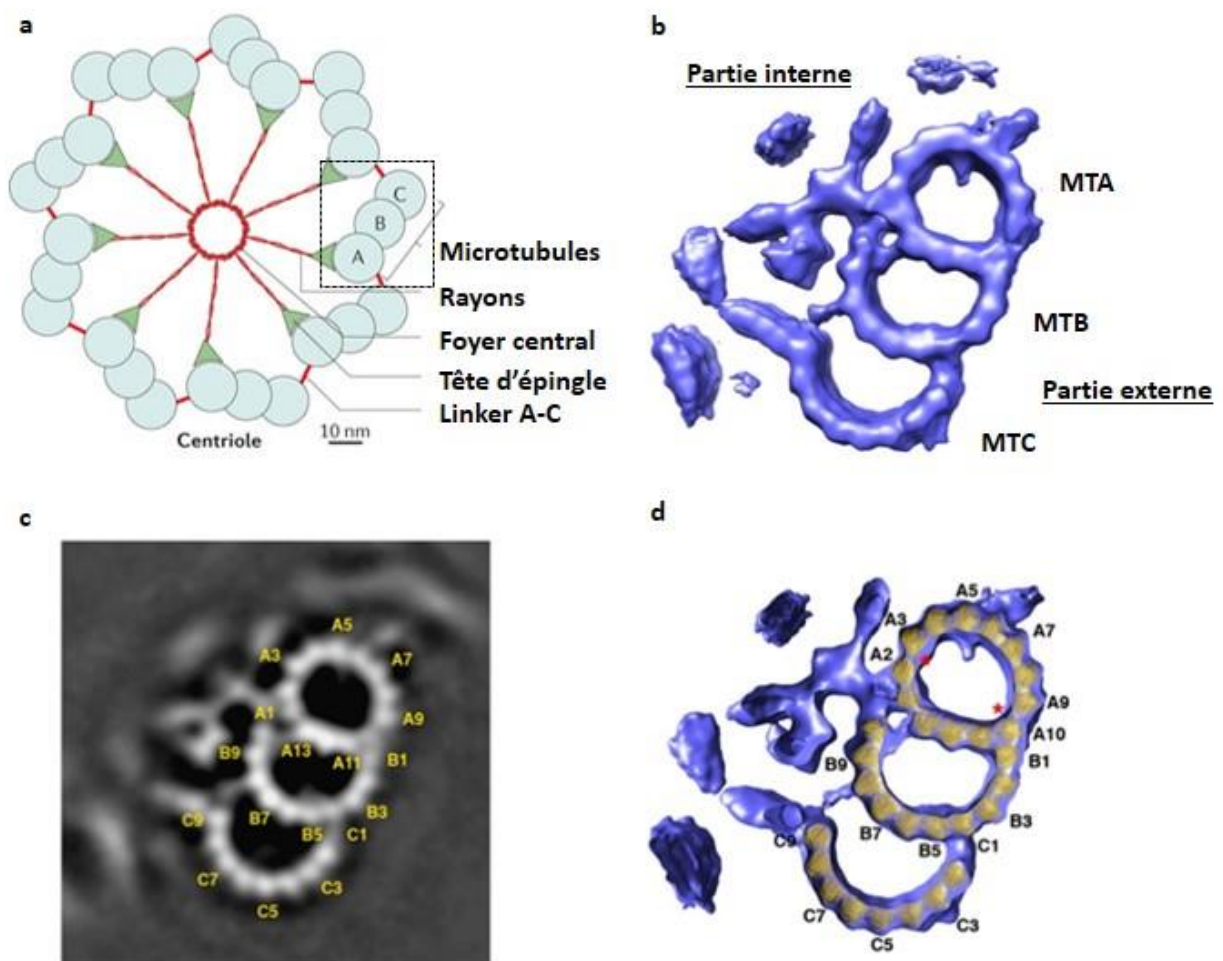


Figure 3: Organisation des protofilaments de tubulines des microtubules A, B et C (adapté de Gönczy et al., 2012 et de Li et al., 2012)

- Représentation schématique d'un centriole. Le cartwheel est caractérisé par un foyer central d'environ 20nm de diamètre, à partir duquel émane les rayons reliés aux MTA par les têtes d'épingle.
- Reconstruction 3D d'un triplet de microtubules à partir de la densité électronique obtenue en microscopie électronique avec une résolution de 33Å.
- Image obtenue en microscopie électronique où on peut distinguer l'ensemble des protofilaments de tubulines, notés de A1 à A13 pour le MTA, et B1 ou C1 à B10 ou C10 pour le MTB et le MTC.
- Représentation 3D issue de l'analyse en microscopie électronique comme vue en b. Ici les protofilaments sont représentés en jaune. Les astérisques rouge représentent deux points où la courbure du microtubule A est la plus importante.

engagées dans le cycle cellulaire et dans lesquelles le centriole père a été supprimé par microdissection laser, suggérant une certaine redondance entre ces deux voies (Azimzadeh and Marshall, 2010; Khodjakov et al., 2002).

1) *La voie centriolaire.*

Dans l'hypothèse de la voie centriolaire (cf. figure 4), la multiplication du nombre de centrioles suit les deux principes suivants : (1) chaque centriole père ne se duplique qu'une et une seule fois à chaque cycle cellulaire ; (2) lors de cette duplication, un seul centriole est synthétisé. Les mécanismes moléculaires contrôlant ces deux principes de base ne sont pas encore bien élucidés.

La première étape commence lors de la transition G1/S du cycle cellulaire avec la formation d'un procentriole le long du centriole père. Cette étape est sous le contrôle de la polo-kinase 4 (PLK4), une kinase régulatrice très conservée au cours de l'évolution (ZYG-1 chez *C. elegans*). Chez *C. Elegans*, SAS-6 est un substrat direct de ZYG-1 (Kitagawa et al., 2011). L'association de la protéine FBXW5 (F-box/WD repeat-containing protein 5) au complexe de l'ubiquitine ligase E3 et sa liaison à SAS6 induit la dégradation de cette dernière après ubiquitination. FBXW5 participerait ainsi au contrôle du nombre de centrioles, en bloquant la formation de nouveaux centrioles. A l'opposé, la phosphorylation par PLK4 de ce complexe inhibe l'activité ubiquitine ligase (Puklowski et al., 2011). Les mécanismes limitant la synthèse à un seul procentriole par cycle restent encore mal élucidés, même si PLK4 peut bien apparaître comme un acteur central de ce contrôle : un excès de PLK4 engendre la formation de nombreux procentrioles, et sa déplétion inhibe la duplication des centrioles (Bettencourt-Dias et al., 2005; Habedanck et al., 2005). Le matériel péricentriolaire, situé à proximité des centrioles semble également jouer un rôle dans le contrôle de la duplication des centrioles, puisque Loncarek et coll. ont observé que l'accumulation du matériel péricentriolaire après surexpression de la péricentrine, induisait une augmentation du nombre de centrioles en l'absence de toute modulation des niveaux de PLK4 (Loncarek et al., 2008).

Plusieurs travaux soulignent l'existence de mécanismes contrôlant la longueur des MT du cylindre, avec notamment l'implication des protéines Cep110 et CPAP, qui agissent de manière antagoniste : une déplétion de Cep110 ainsi qu'une surexpression de CPAP induisent un allongement des centrioles (Schmidt et al., 2009 ; Spektor et al., 2007; Tang et al., 2009). De manière intéressante, Cep110 est localisé dans la partie distale du centriole, suggérant un rôle de coiffe inhibant l'élongation des MT (Azimzadeh and Marshall, 2010).

Après la mitose, la maturation du centriole fils le transforme en centriole père qui va pouvoir servir à son tour de base pour l'assemblage d'un nouveau centriole fils au cours du cycle suivant. En

parallèle de l'assemblage/synthèse du centriole fils, des connexions entre les centrioles fils et père semblent jouer un rôle clé dans le contrôle du nombre de procentrioles assemblés.

Le SML (S-M linker car présent de la phase S jusqu'à la mitose), constitue un lien physique entre le centriole père et le procentriole à partir de la phase S. De composition inconnue, le SML serait dissout après activation de la polo-kinase-1 (PLK1) et de la séparase, permettant ainsi le désengagement des deux centrioles. Ce processus prendrait place lors de la transition anaphase/métaphase au même moment que la séparation des chromatides. La cohésine, impliquée dans le maintien des chromatides, serait clivée par la séparase de façon à permettre la séparation des chromatides sœur. De façon intéressante, il a été remarqué que le clivage de la cohésine est nécessaire pour la séparation des centrioles (Schockel et al., 2011). Ce modèle permettrait d'expliquer le lien fort entre séparation des chromatides et contrôle du nombre de centrioles. En effet, un arrêt de contrôle du nombre de centrioles et la création de multiples centrioles pourrait engendrer la création de multiples fuseaux mitotiques, créant une instabilité génétique, comme prédit par l'hypothèse de Theodore Boveri sur la multiplication des centrioles dans les cancers.

2) Voie acentriolaire

La voie acentriolaire est une deuxième voie de synthèse des centrioles présente chez la plupart des eucaryotes. Elle permet une synthèse simultanée de centaines de centrioles au sein d'une même cellule (Sorokin, 1968). Les acteurs moléculaires la différenciant de la voie classique sont également inconnus. Si la suppression par microdissection du centriole inhibe la formation de nouveau centriole (Meyrick and Reid, 1970), la même expérience réalisée sur des cellules synchronisées en phase S, induit alors la création *de novo* de corps fibro-granulaires comportant de multiples centrioles. Ces corps fibro-granulaires sont appelés deutérosomes (cf. Figure 5) (Khodjakov et al., 2002), et ressemblent morphologiquement à ceux observés dans les cellules multiciliées (Anderson and Brenner, 1971; Sorokin, 1968).

3) Identification des acteurs de la duplication des centrioles : les approches globales.

Paradoxalement, et alors que des analyses protéomiques des centrosomes humains révèlent la présence de centaines de protéines distinctes (Andersen et al., 2003; Gherman et al., 2006; Inglis et al., 2006; Jakobsen et al., 2011), seuls six gènes (SAS-4, SAS-5, SAS-6, SPD-2, TBG-1, ZYG-1) ont été définis lors d'un crible RNAi chez *C. elegans* comme indispensables à la formation des centrioles (O'Connell et al., 2001; Strnad and Gonczy, 2008) : la kinase ZYG-1, les protéines type coiled-coil SPD-

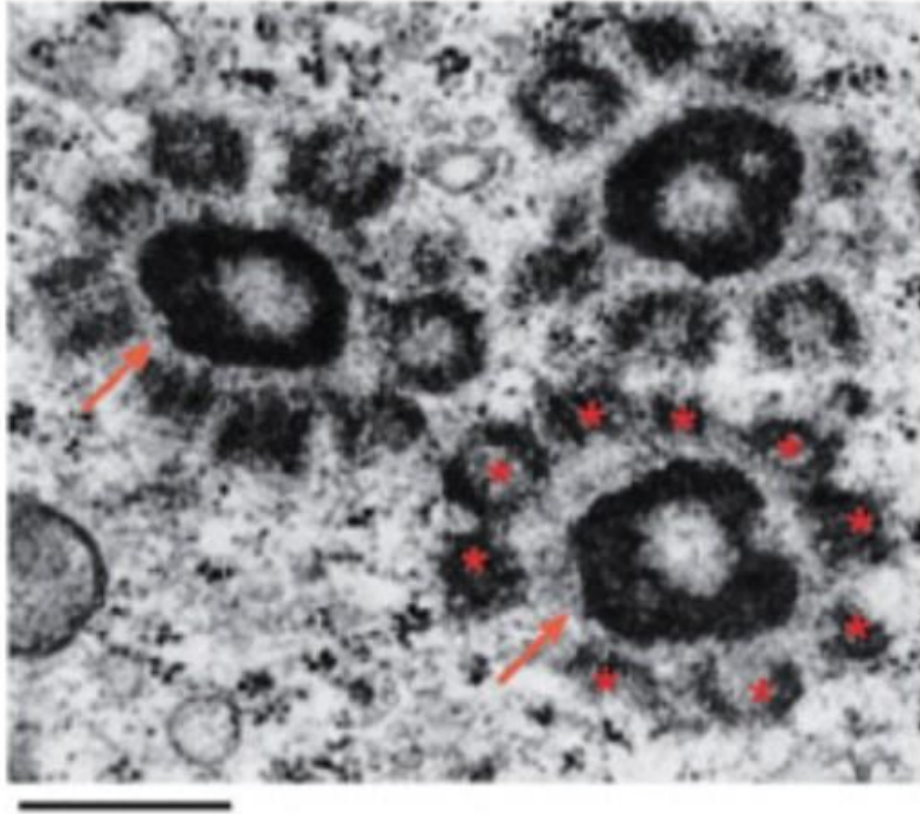


Figure 5: La voie acentriolaire: les deuterosomes

Photo de microscopie électronique montrant la présence de 3 complexe de deuterosomes. Le deuterosomes (indiqués par une flèche rouge) donnent naissance à plusieurs centrioles (indiqués par une astérisque rouge). La barre d'échelle représente 0,25 μ M (Dirksen et al., 1971).

2, SAS-4, SAS-5 et SAS-6, et la sous-unité gamma de la tubuline, TBG-1. Certains éléments clés sont bien conservés au cours de l'évolution, quelques protéines importantes supplémentaires étant notamment conservées du ver jusqu'à l'homme (Dobbelaere et al., 2008; Leidel et al., 2005). Mais cette conservation concerne principalement PLK4/ZYG-1 et la protéine SAS-6, dont le niveau d'expression est un élément important pour le contrôle du nombre de centrioles assemblés (Kleylein-Sohn et al., 2007; Peel et al., 2007; Puklowski et al., 2011).

3. L'axonème

A. Structure de l'axonème

La structure des cils motiles chez les mammifères a été explorée par microscopie électronique sur différents types cellulaires, notamment issus de l'épithélium respiratoire (Sorokin, 1968). L'axonème est constituée de doublets de MT (cf. figure 6). En règle générale, les cils motiles, qui possèdent 9 doublets périphériques de MT et 2 MT centraux (notés 9+2), se distinguent des cils non-motiles qui sont dépourvus de MT centraux (notés 9+0) (Nicastro et al., 2006; Sui and Downing, 2006). Pour assurer la motilité de l'axonème et induire le battement ciliaire, les cils motiles possèdent aussi des dynéines et des rayons (« radial spokes ») alors que les cils non motiles en sont dépourvus (Satir and Christensen, 2007). Ainsi, des mutations des protéines de la partie radiale chez *Chlamydomonas* abolissent la motilité ciliaire et affectent la structure de l'axonème (Huang et al., 1982; Piperno et al., 1977; Witman et al., 1978). Les bras de dynéines internes et externes constituent les moteurs moléculaires, qui par leur activité ATPase produisent le glissement entre doublets, activant l'axonème, entraînant ainsi le battement ciliaire (Gibbons, 1963).

Des études réalisées chez *Chlamydomonas* ont permis d'établir que l'élongation de l'axonème par un mécanisme dépendait d'une machinerie de transport intra-flagellaire (IFT : intraflagellar transport ou transport intraflagellaire), capable de transporter les molécules nécessaires à cette élongation (Kozminski et al., 1993).

Le diamètre de cette structure microtubulaire est d'environ 0.25 µm et sa longueur peut varier de quelques microns à 50µm. Les doublets de MT périphériques sont constitués chacun d'un MTA et d'un MTB. le MTA est complet (13 proto-filaments d'hétéromères alpha et beta) alors que le MTB est incomplet (10 proto-filaments) (Warner and Satir, 1973).

Enfin, les tubulines peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui jouent également un rôle important dans la motilité du cil (cf. partie I. 3. C) (Ikegami et al., 2010; Pathak et al., 2007; Suryavanshi et al., 2010; Wloga et al., 2009).

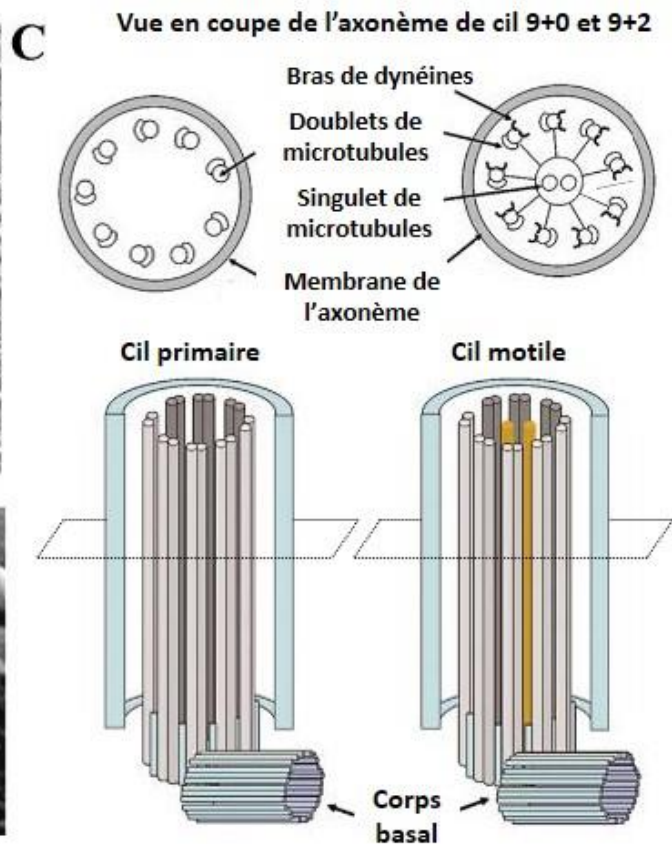
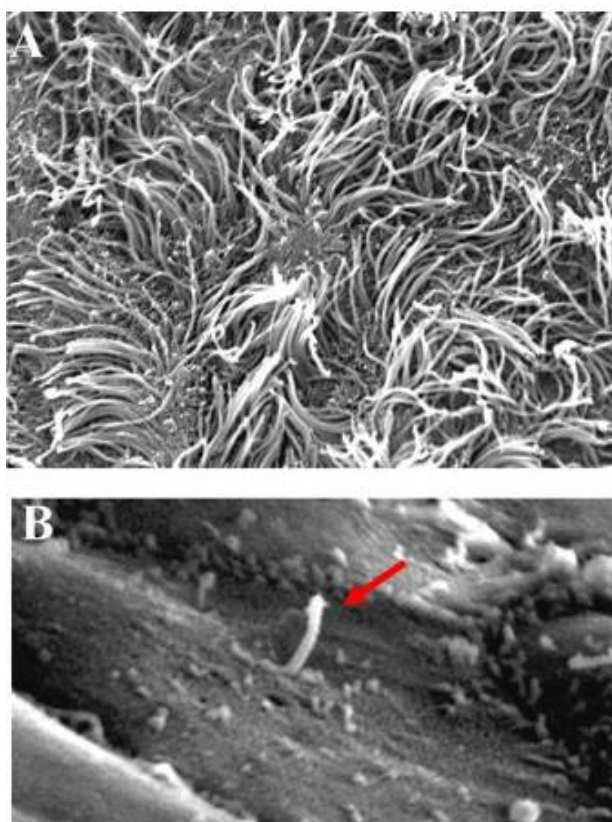


Figure 6: Structure de l'axonème du cil primaire et des cils motiles (d'après Davenport et al., 2005)

A. Microscopie électronique de cils motiles présents chez la souris dans les cellules épendymales sur les ventricules latéraux.

B. Microscopie électronique d'un cil primaire indiqué par la flèche rouge.

C. Représentation schématique de la structure de l'axonème d'un cil primaire (type 9+0 à gauche) ainsi qu'un cil motile (type 9+2 à droite) caractérisé par la présence de deux microtubules centraux et de bras de dynéines permettant la motilité ciliaire.

B. Synthèse de l'axonème et poche ciliaire

L'axonème constitue le cytosquelette microtubulaire du cil. Il est élaboré à partir du corps basal et bordé par la membrane ciliaire qui prolonge la membrane cytoplasmique. En dépit de ce *continuum*, la composition de la membrane du cil est très distincte de la membrane cytoplasmique, une barrière de diffusion la séparant du reste de la cellule. Cette barrière de diffusion ciliaire est composée à la base du cil par les fibres striées et les appendices distaux des corps basaux tous deux reliés à la membrane cytoplasmique d'une part, et à la zone de transition d'autre part, qui elle, relie la partie la plus distale du corps basal à la membrane de l'axonème (Hu and Nelson, 2011; Reiter et al., 2012). L'apport des composants et leur transport le long de l'axonème sont effectués grâce à la machinerie de transport intra-flagellaire (IFT) spécifique. Les particules IFT sélectionnent les cargos à adresser vers l'axonème, le transport le long de l'axonème étant effectué par des mécanismes de IFT antérograde (noté IFTA, allant du corps basal jusqu'à l'extrémité de l'axonème) et rétrograde (noté IFTB, allant de l'extrémité de l'axonème jusqu'au corps basal), mettant en jeu des molécules de kinésines II et de dynéines 2 comme moteurs moléculaires, respectivement (cf. figure 7) (Pedersen and Rosenbaum, 2008).

Dans la majorité des types cellulaires, un cil primaire est logé au fond d'une invagination membranaire riche en clathrine. Du fait de sa ressemblance avec la poche flagellaire de Trypanosome, site unique d'endocytose dans cet organisme, Ghossoub et coll. ont baptisé ce domaine « poche ciliaire ». La poche ciliaire interagit avec le cytosquelette d'actine, qui est important pour le bon positionnement du cil. Une même poche ciliaire est également détectée à la base des cils mobiles et flagelles, qui apparaîtrait comme une véritable interface d'interaction des cils avec le cytosquelette d'actine et différentes voies de trafic vésiculaire. L'observation en microscopie électronique de la poche ciliaire sur différents types cellulaires indique une organisation du cytosquelette relativement stable en fonction des types cellulaires cependant des différences dans l'organisation membranaire ont pu être observées : dans certains cas une poche ciliaire apparaît directement à la membrane apicale où se situe le corps basal alors que dans d'autres types cellulaires la poche ciliaire apparaît au niveau proximal du corps basal (Barnes, 1961; Latta et al., 1961; Munger, 1958; Sorokin, 1968). Deux modèles ont été proposés par Sorokin à partir de nombreuses observations de microscopie électronique. Une première voie d'assemblage dite extracellulaire où les corps basaux une fois ancrés à la membrane, recrutent des vésicules qui permettent l'assemblage du cil directement à la surface de la cellule comme observé dans les cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire (Sorokin, 1968). La deuxième voie correspond à la voie d'assemblage intracellulaire. Dans ce cas, des vésicules cargo riches en clathrine (protéine structurelle constituant l'enveloppe de certaines vésicules), s'assemblent au niveau du corps basal, induisant la formation d'une poche appelée poche ciliaire. A partir de là,

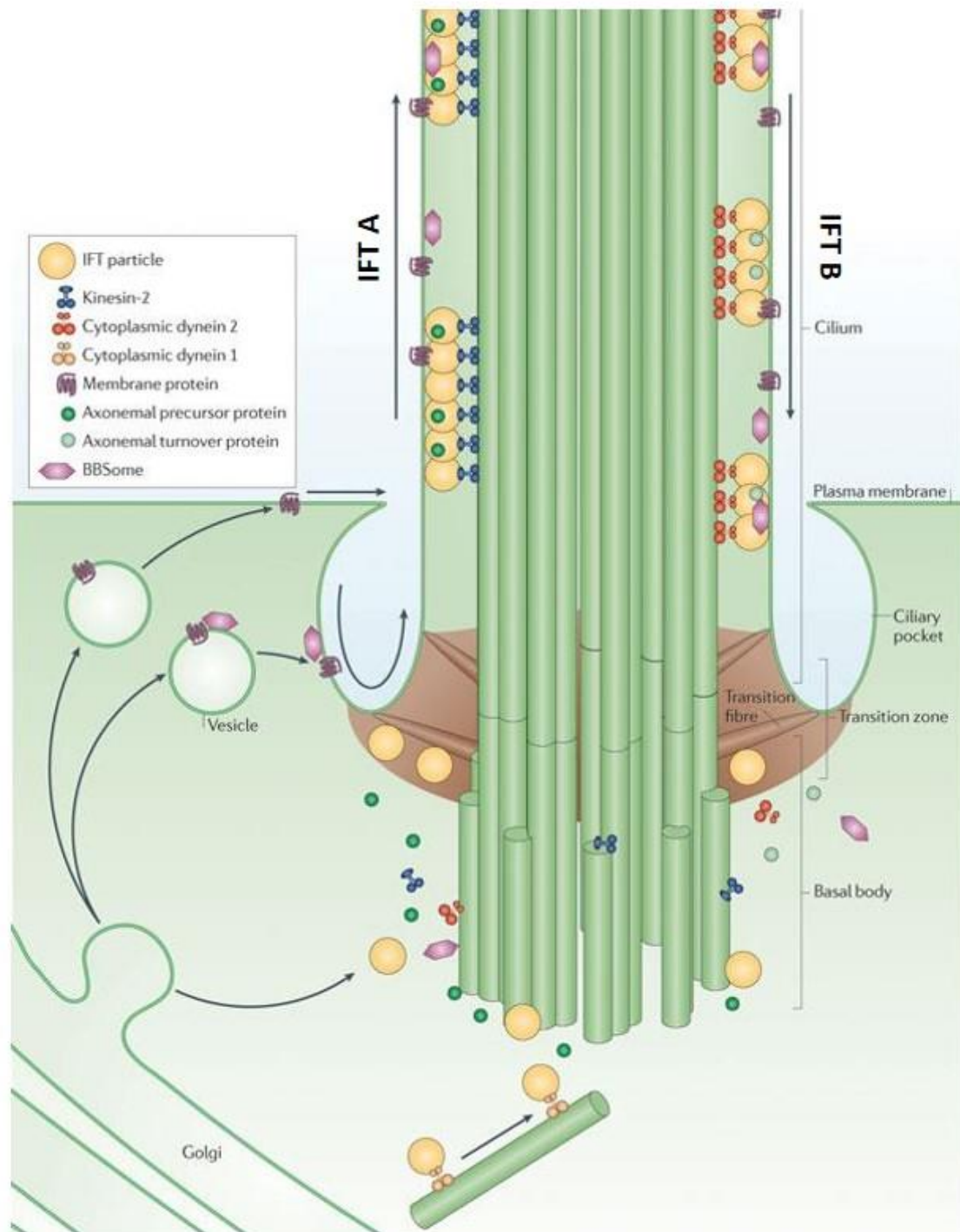


Figure 7: Transport intra-flagellaire du cil (d'après Ishikawa et Marshall, 2011)

Les protéines destinées au cil sont transportées par des vésicules d'exocytose venant de l'appareil de Golgi jusqu'à la base du cil et mettant en jeu des dynéines cytoplasmiques 1 et 2.

Une fois à la base du cil, seules les protéines destinées au cil passent la zone de transition (marron foncé) définie par les fibres de transition présentes à la base du cil. Les protéines associées à des dynéines cytoplasmiques 2 inactives, sont transportées par des kinésines II: c'est le transport antérograde ou IFTA. Une fois à l'apex du cil, les particules IFT subissent des modifications entraînant l'inactivation de la kinésine II et l'activation de la dynéine cytoplasmique 2 jusque-là inactive. Le transport rétrograde ou IFTB sert au recyclage ou à la dégradation de certaines protéines ciliaires (par exemple les récepteurs PGDF).

l'axonème effectue son élongation, la poche ciliaire fusionne à la membrane cytoplasmique et le cil peut alors s'étendre et se prolonger à l'extérieur de la cellule (Ghossoub et al., 2011).

C. Modifications post-traductionnelles des microtubules de l'axonème

Les tubulines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) dans la partie C-terminale des tubuline α et β . Parmi ces MPT, on peut citer des détyrosinations (Arce et al., 1975), des acétylations (L'Hernault and Rosenbaum, 1985), des phosphorylations (Eipper, 1972), des glutamylations (Redeker et al., 1992) et des glycylation (Redeker et al., 1994). Ces modifications affectent la longueur des polymères, et une molécule de tubuline seule peut contenir plusieurs types de modifications sur plusieurs sites (cf. figure 8A). Ainsi les axonèmes matures peuvent être composés de plusieurs centaines d'isoformes distinctes de tubulines (Redeker et al., 2005).

L'acétylation de la tubuline alpha a été une des premières MPT identifiées (Greer et al., 1985). L'axonème des cils est acétylé (Gaertig et al., 1995), et une absence d'acétylation n'affecte pas la formation du cil. Cependant, le rôle de l'acétylation dans le maintien de l'axonème reste à être confirmé. Concernant les glutamylations et les glycylation, ces MPT sont catalysées par les protéines TTL-like (TTLL), qui possèdent un certain degré d'homologie avec les TTL (Tubulin tyrosine ligase) (Ikegami and Setou, 2009), selon deux étapes distinctes : l'initiation et l'élongation. Ces deux étapes peuvent faire intervenir dans certains cas plusieurs TTLL. La phase d'élongation prend place progressivement après la synthèse de l'axonème et peut donc révéler si l'axonème est en cours de synthèse ou est dans un état de maintien. Les glutamylations sont des modifications des tubulines retrouvées de façon très abondante dans l'axonème des cils, les centrioles, les corps basaux ainsi que certains MT cytoplasmiques (Bobinnec et al., 1998). Les glycylation ne sont quant à elles observées que dans l'axonème des cils ou dans les corps basaux, et semblent restreintes aux seules cellules ciliées (Bre et al., 1996).

L'injection d'anticorps reconnaissant les glutamylations dans des cellules de mammifères induit la déstabilisation des centrioles (Bobinnec et al., 1998). Des souris mâles mutantes de TTLL1 sont infertiles, mais aucun défaut structural n'affecte les cils motiles de la trachée. En revanche, leur motilité est fortement affectée (Ikegami et al., 2010; Vogel et al., 2010). De manière surprenante, chez les souris n'exprimant plus TTLL1 de façon constitutive, les cils battent beaucoup plus rapidement et sont caractérisés par un défaut de courbure du cil motile lors de la phase de rétablissement (cf. partie II. 2. J. 3) e). La force produite par la phase de rétablissement et la phase de propulsion (cf. partie II. 2. J. 3) e) s'annulent et la clairance mucociliaire est alors fortement affectée. Lors du battement ciliaire, les dynéines jouent un rôle primordial. On distingue deux types de bras de dynéines: les bras de dynéines internes (IDA) et les bras de dynéines externes (ODA) (cf. partie I. 3. A). Les ODA affectent la fréquence

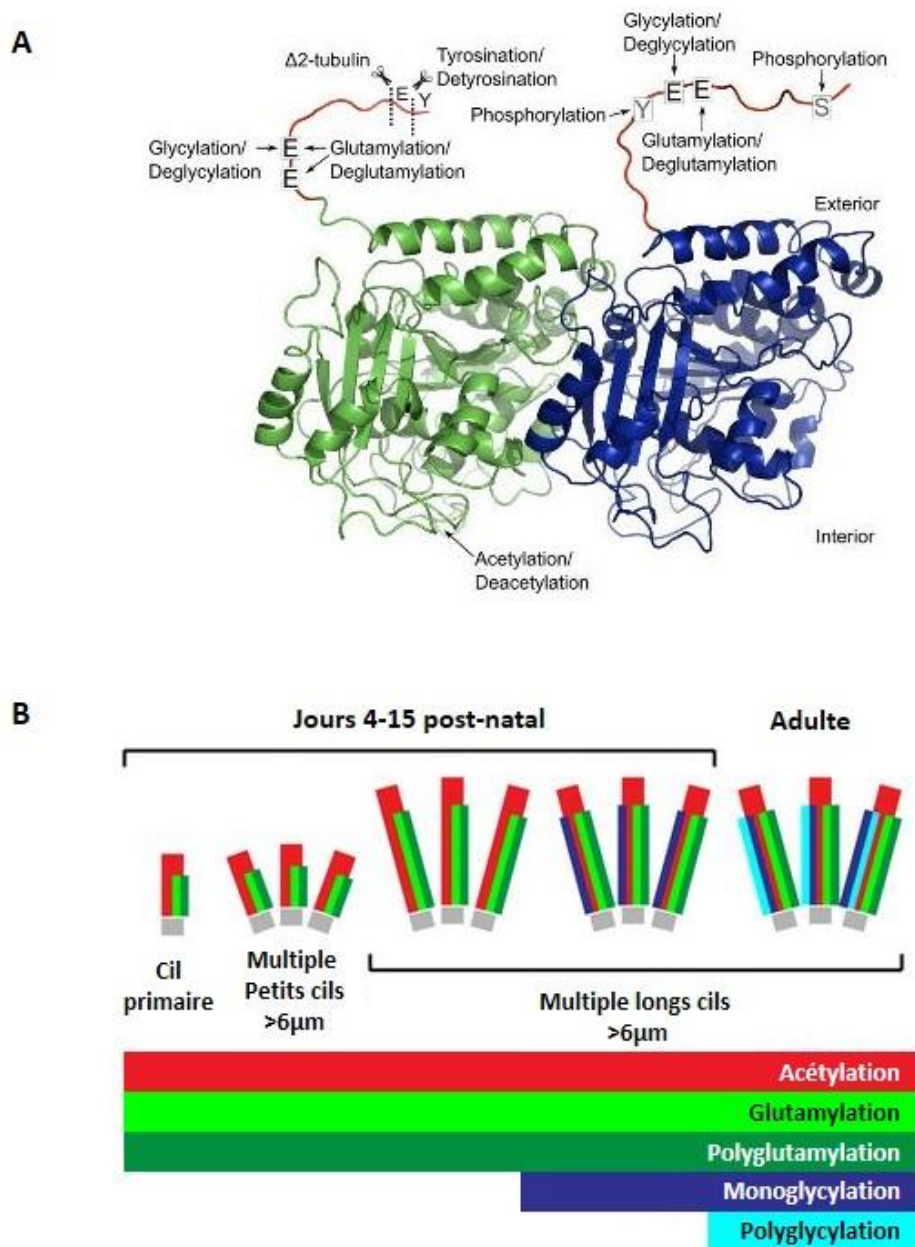


Figure 8: Modifications post-traductionnelles retrouvées sur les dimères de tubuline alpha et beta lors de la ciliogenèse

A. Les différents sites où s'effectuent des modifications post-traductionnelles sont indiqués sur cette représentation 3D d'un hétérodimère de tubuline α/β . La tubuline α est en vert et la tubuline β en bleue (d'après Garnham et al., 2012).

B. Représentation schématique des différentes modifications post-traductionnelles au cours de la formation des cils dans les cellules épendymales chez la souris (d'après Bosch Grau et al., 2013).

de battement ciliaire alors que les IDA affecte la courbure du cil motile lors du battement ciliaire (pour revue voir (Kamiya, 2002)). Ainsi l'étude de mutants de TTLL6 et TTLL9 chez les protistes a permis de relier la glutamylation aux IDA (Kubo et al., 2010; Suryavanshi et al., 2010).

Récemment, une étude à partir de cils d'épendymocytes de souris a révélé que ces modifications ont lieu dès l'apparition du cil motile et augmentent avec la maturation ciliaire (cf. figure 8B), soulignant l'importance de TTLL3 et TTLL8 dans la stabilité du cil motile (Bosch Grau et al., 2013). Cette étude confirme de nombreuses observations effectuées dans d'autres modèles et montrent le rôle conservé au cours de l'évolution de ces MPT, même si l'identification et le rôle de toutes les enzymes impliquées demeurent encore incertains (la déplétion de certaines enzymes ne modifiant pas les tubulines, ce qui suggère des rôles redondants pour certaines d'entre elles) (Rogowski et al., 2009). TTLL6 serait importante pour la motilité ciliaire, alors que d'autres, comme TTLL1, n'induisent aucun phénotype particulier (Bosch Grau et al., 2013).

D. Contrôle de l'expression des gènes lors de la ciliogenèse

Le contrôle de l'expression des gènes liés à la ciliogenèse a été étudié tout d'abord chez *Chlamydomonas* et chez les échinidés. Dans ces deux modèles, des stress chimiques ou mécaniques permettent d'induire la perte des cils ou du flagelle, qui se reconstituent ensuite rapidement (environ 90 min chez *Chlamydomonas*). Ainsi il a été montré que la reconstitution du flagelle est caractérisée par une augmentation importante d'ARNm codant pour les tubulines alpha et bêta (Keller et al., 1984). La reformation des cils chez les embryons d'échinidés a aussi révélé la présence de gènes liés aux cils (Harlow and Nemer, 1987; Norrander et al., 1995). Des approches plus récentes ont permis de déterminer la présence de nombreux gènes impliqués dans la reformation du flagelle chez *Chlamydomonas* (Pazour et al., 2005; Stolc et al., 2005). Ces différentes études ont permis d'identifier de nombreux acteurs importants, impliqués notamment dans la composition des cils et des flagelles. Malgré ces travaux, la recherche de séquences consensus communes sur les promoteurs des gènes induits n'ont pas permis d'identifier avec certitude des facteurs de transcription pouvant contrôler leur expression (Pazour et al., 2005; Stolc et al., 2005).

D'autres éléments de réponse ont été apportés par des études transcriptomiques effectués dans plusieurs tissus ciliés, où les facteurs de transcriptions FOXJ1 et RFX3 jouent un rôle important dans le déclenchement, le maintien ou l'élaboration de la ciliogenèse.

FOXJ1 est conservé chez tous les vertébrés, un orthologue de FOXJ1 est présent dans le génome des planaires et des échinidés (Mazet et al., 2003). FOXJ1 est un facteur de transcription associé à la transcription des composants des cils motiles, y compris chez les invertébrés (Bonnafe et al., 2004; Stubbs et al., 2008; Vij et al., 2012; You et al., 2004; Yu et al., 2008b). Par ailleurs, dans les

Nom du gène		A mean	J7 - J0	J14 - J7	J21 - J14	J21 - J0
Foxj1	Forkhead box J1	9,2	0,9	3,1	0,2	4,1
Dnahc9	Dunein, axonemal, heavy chain 9	7,5	-0,1	4,2	0,4	4,6
Iqca	IQ-motif-containing with AAA domain	7,3	-0,3	1,8	0,1	1,7
Wdr66	WD repeat domain 66	8,7	-0,4	3,3	0,1	2,9
Efhc1	EF-hand-domain-(C-terminal)-containing 1	8,5	-0,2	4,4	0,1	4,2
Tekt4	Tektin-4	-	-	-	-	-
Spata17	Spermatogenesis-associated 17	7,4	0,6	4,5	-0,1	5,0
Spa17	Sperm-autoantigenic protein 17	8,5	-0,2	3,4	0,0	3,1
Dynlrb2	Dynein light chain roadblock-type 2	5,3	0,1	3,7	0,1	3,9
Dnalc1	Dynein, axonemal, intermediate chain 1	6,6	0,2	2,7	0,1	3,0
Syne1	Synaptic nuclear envelope 1	6,8	0,2	3,1	0,2	3,5
Spag6	Sperm-associated antigen 6	8,0	1,3	5,3	0,2	6,8
Dnal1	Dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1	6,6	0,2	2,7	0,1	3,0
Tm4sf1	Transmembrane protein/tetraspanin family	11,3	-1,1	-0,4	0,0	-1,5
Kif9	Kinesin family member 9	7,2	0,2	3,2	0,1	3,5
Rsph4a	Radial spoke head 4 homologue A	-	-	-	-	-
NEK5	NIMA-related protein kinase 5	7,0	0,8	3,6	0,1	4,5

Tableau 1: Gènes régulés par FOXJ1 chez le Xénope et chez la souris

Le tableau indique les gènes régulés par Foxj1 ainsi que le nom complet du gène. Aussi sont indiquées les variations pour ces gènes observées au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire nasal humain sur 4 points de cinétique: J0/7/14/21 correspondant au nombre de jours après la passage en air-liquide: ici 0/7/14/21 respectivement. La première colonne « A mean » correspond à l'intensité moyenne du signal détectée en puces transcriptomique et reflète l'expression relative de chacun des gènes. Les colonnes suivantes correspondent aux variations (log base 2) entre 2 points successifs de cinétique. La dernière colonne indique la variation sur l'ensemble de la différenciation de l'épithélium respiratoire. Le code couleur met en avant les variations observées selon la règle des centiles avec en vert les valeurs inférieures et en rouge les valeurs supérieures. Pour Tekt4 et Rsph4a aucune valeur n'a pu être extraite de l'analyse.

cellules épithéliales respiratoires en cours de la différenciation multiciliée, l'expression de FOXJ1 est nécessaire à la disparition du cil primaire au profit de l'apparition de multiples cils motiles (Jain et al., 2010). Il a d'ailleurs été montré que FOXJ1 contrôle directement l'expression de certaines dynéines, de protéines radiales et de composants des cils motiles (Chen et al., 1998; Jacquet et al., 2009; Stubbs et al., 2008; Yu et al., 2008b) (cf. tableau 1). Plus récemment, des expériences de ChIP (chromatin Immunoprecipitation) ont identifié d'autres cibles de FOXJ1 *in vivo* chez le poisson zèbre (Yu et al., 2008b), cependant aucune analyse par séquençage haut débit des promoteurs associés n'a encore été effectuée pour identifier l'ensemble des gènes régulés par FOXJ1. Chez la souris, une analyse transcriptomique suggère que FOXJ1 pourrait contrôler l'expression d'environ 200 gènes (Jacquet et al., 2009). Chez la drosophile, le facteur de transcription FOXJ1 n'est pas conservé. Cependant on observe la présence d'un cil motile dans l'organe chordotonal (constituant l'appareil auditif chez les insectes), caractérisé par la présence de bras de dynéine. Ainsi, d'après cette observation il est admis que d'autres facteurs interviennent dans la motilité ciliaire. Chez la drosophile, il est proposé que le facteur FD3F joue un rôle homologue à FOXJ1 (Newton et al., 2012).

La famille RFX de facteurs de transcription (**R**egulatory **F**actor, se fixant sur des régions promotrices à motifs **X**-box), présente chez la drosophile comme chez les vertébrés, participe au contrôle de la biogénèse des cils. Les cibles des RFX caractérisées dans différents modèles, indiquent clairement un rôle de la famille RFX dans la transcription d'un groupe de gènes codant pour des protéines associées au transport moléculaire, à l'assemblage et à la fonction du cil (Bonnafe et al., 2004; El Zein et al., 2009; Piasecki et al., 2010). Chez les vertébrés, il existe plusieurs protéines RFX (7 chez l'Homme et 5 chez la souris) qui reconnaissent des motifs de type X-box. La délétion de certaines protéines RFX abolit la ciliogénèse suggérant un rôle important dans la formation du cil. Chez la souris, la délétion unique d'un seul membre RFX n'est pas suffisante pour affecter la ciliogénèse dans l'ensemble des tissus, suggérant des mécanismes compensatoires par d'autres membres de la famille. Cette observation est renforcée par le fait que les RFX1/2/3 reconnaissent les mêmes motifs promoteurs, et que les autres membres n'induisent pas de phénotypes liés à des défauts de ciliogénèse. De façon intéressante, il est à noter la surexpression de RFX3 n'est pas suffisante pour induire le programme génique des cellules multiciliées cependant elle potentialise les effets de l'expression de FOXJ1 (Didon et al., 2013).

Quelques autres facteurs semblent également impliqués dans la transcription de gène codant pour la formation des cils (cf. figure 9). Ainsi, le gène homéotique noto pourrait-il contrôler le niveau de transcription de FOXJ1, de RFX3 et de leurs gènes cibles (Beckers et al., 2007). Chez le poisson Médaka, noto est lui-même régulé par un gène de la famille polycomb : OLEED (EED chez la souris). De

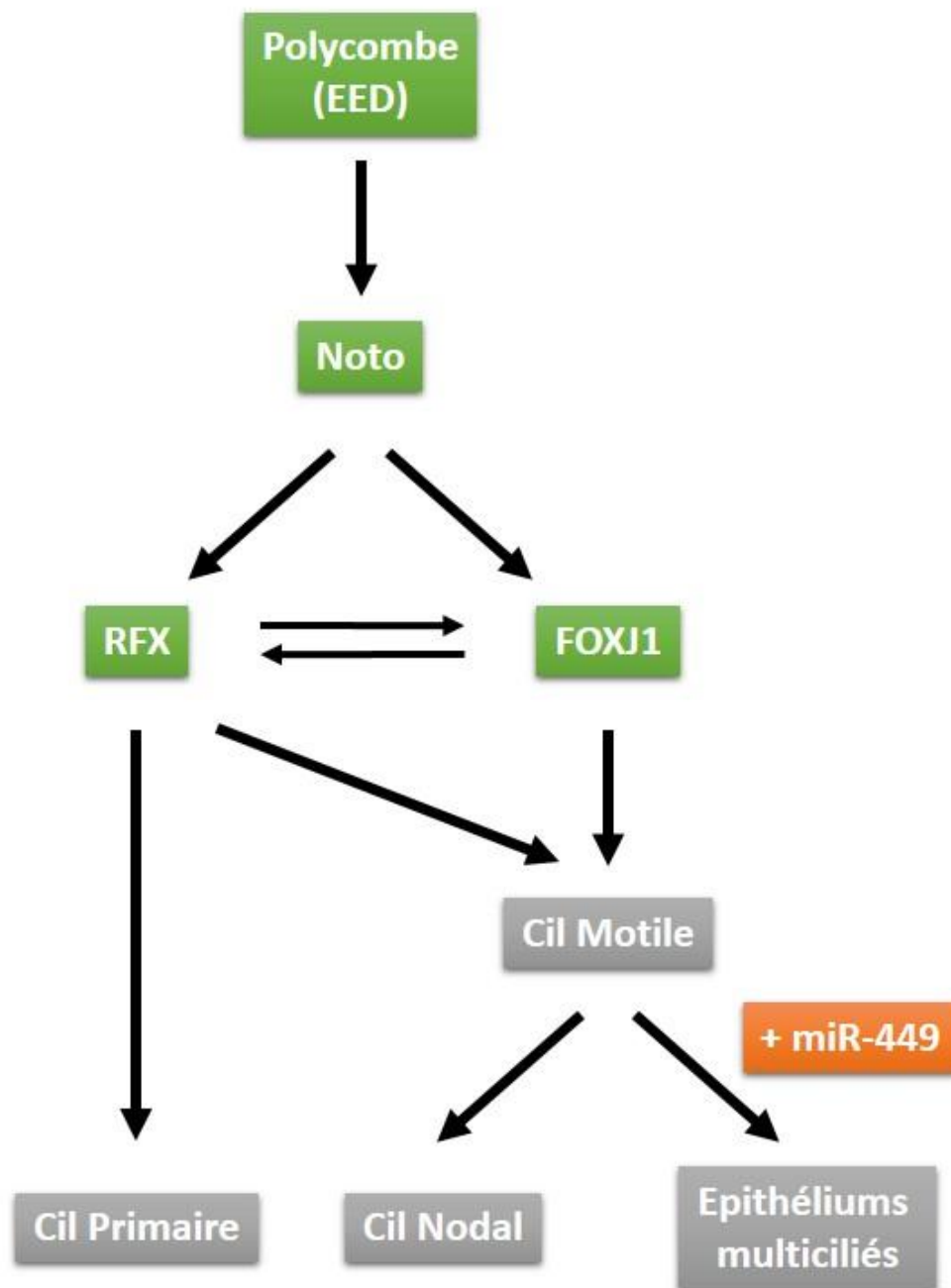


Figure 9: Facteurs de transcription impliqués dans la formation des différents types de cils

Représentation hiérarchique des principaux facteurs suggérés comme étant à l'origine de l'expression de l'ensemble des cils retrouvés (ex. ici chez l'homme). Les facteurs de transcription sont sur fond vert, les types de cils sur fond gris. Comme nous le verrons dans la partie résultats, nous proposons que miR-449 est impliqué spécifiquement dans la formation de cellules possédant plusieurs cils motiles.

manière intéressante, le mutant OLEED peut être reversé par la surexpression de l'orthologue de noto chez le poisson Médaka (Arai et al., 2009).

4. Une vision de la ciliogenèse à la lumière de l'évolution

A. Les cils chez les eucaryotes

Les centrioles et les cils sont des structures très conservées au cours de l'évolution des eucaryotes. Les récentes expériences de séquençage et l'annotation de nombreux génomes eucaryotes couplées au criblage par ARN interférence (Balestra et al., 2013; Dobbelaere et al., 2008) et à l'identification par spectrométrie de masse des composants des centrioles et des cils (Andersen et al., 2003) ont permis d'établir des listes de protéines associées à la structure et à l'assemblage des centrioles/cils (Gherman et al., 2006; Inglis et al., 2006) (cf. figure 10). Les analyses phylogéniques suggèrent déjà leur existence au niveau du dernier ancêtre eucaryote commun (LECA pour Last Eukaryotic Common Ancestor) (Baldauf, 2003; Baldauf et al., 2000; Cavalier-Smith, 2002; Hedges, 2002; Hodges et al., 2010). La plupart des organismes étudiés possèdent en effet un centriole avec une symétrie d'ordre 9, un cartwheel, des triplets de MT et un axonème avec la présence de 9 doublets de MT liés à des bras de dynéines internes et externes, entourant (éventuellement) une paire de MT centraux, ce qui suggère fortement la présence d'une telle structure chez LECA. Il existe cependant quelques exceptions au sein des eucaryotes: les champignons, les plantes supérieures à graines ou les algues rouges sont effectivement dépourvues de cils. Mais de manière intéressante, des analyses génomiques chez des plantes supérieures indiquent la présence d'orthologues ancestraux de protéines ayant un rôle dans la ciliogénèse (Hodges et al., 2011). Cela indiquerait une perte de cette organelle au cours de l'évolution au sein de cette branche (Baldauf et al., 2000; Marshall, 2009).

B. Les différentes hypothèses pour l'apparition des cils

La question de l'apparition du cil et du centriole au cours de l'évolution apparaît comme une parfaite illustration du problème classique de l'œuf et de la poule, puisque la création d'un nouveau centriole nécessite la présence d'un centriole père: comment dans de telles conditions, le centriole a-t-il pu apparaître une première fois ?

Contrairement à d'autres organelles qui se multiplient par fission, le centrosome dérive d'une manière semi-conservative d'un centriole père. Incidemment, de toutes les organelles eucaryotes qui s'auto-multiplient (noyau, mitochondries, chloroplastes, centrosome), le centrosome serait la seule organelle à ne pas posséder d'acides nucléiques. Cette caractéristique a conduit certains auteurs à

		Ancestrale														Holozoa														Pole		
		Contrôle		Cœur										Kinases		Centrosomale																
		γ-tubulin EB1	XMAP215	δ-tubulin e-tubulin	Centrin 2	WDR16	SAS-4	SAS-6	POC1	CEP164	DIP13	VFL1	CEP76	CEP135	POC5	Centriolin	PLK	PLK4	ZYG-1	CEP192/SPD-2	PCM1	CP110	CEP97	Ninein	SZY-20	Rootletin	Asterless	NAP1	CEP68			CEP55
	Arabidopsis thaliana	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Populus trichocarpa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oryza sativa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Physcomitrella patens	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ostreococcus tauri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Chlamydomonas reinhardtii	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cyanidioschyzon merolae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Trypanosoma brucei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Leishmania major	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Naegleria gruberi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Giardia lamblia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Trichomonas vaginalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Plasmodium falciparum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Theileria annulata	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Toxoplasma gondii	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cryptosporidium parvum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tetrahymena thermophila	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Paramecium tetraurelia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Phaeodactylum tricornutum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Thalassiosira pseudonana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phytophthora sojae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Aureococcus anophagefferens	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Homo sapiens	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gallus gallus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Takifugu rubripes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Danio rerio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ciona intestinalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Strongylocentrotus purpuratus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Drosophila melanogaster	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Apis mellifera	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Caenorhabditis elegans *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Capitella sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lottia gigantea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nematostella vectensis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Trichoplax adhaerens	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Monosiga brevicollis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Neurospora crassa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Saccharomyces cerevisiae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Schizosaccharomyces pombe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ustilago maydis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Rhizopus oryzae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Batrachochytrium dendrobatidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Encephalitozoon cuniculi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Entamoeba histolytica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dictyostelium discoideum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Figure 10: Conservation et distribution des protéines du centriole et du centrosome chez les eucaryotes (d'après Hodges et al., 2010)

Le tableau récapitule les protéines homologues dans 45 génomes d'eucaryotes. Parmi ces 45 eucaryotes, 29 possèdent des cils et 16 n'en possèdent pas (espèces en fond saumoné). Pour chaque protéine un symbole (+) est noté quand un homologue est retrouvé dans le génome sinon un symbole (-) est mis. Les protéines notées contrôles (fond noir) sont des protéines associées aux microtubules de manière générale. Les protéines notées "Cœur" (fond rouge) sont des protéines ancestrales conservées formant le centriole. Les protéines notées "kinases" (fond bleu) sont des kinases impliquées dans la multiplication des centrioles. Les protéines notées "centrosomale" (fond jaune) sont des composants du centrosome. Les protéines notées "pole" sont des protéines qui pourraient avoir rempli une fonction dans le fuseau polaire ancestral. L'astérisque à côté de *C. elegans* indique la dérive au cours de l'évolution des séquences des protéines « cœur » et « centrosomales ». Des homologues sont connus dans la littérature pour certaines de ces protéines mais non identifiés par cette approche et sont indiquées par un encadrement rose.

supposer qu'un pool d'acides nucléiques centriolaires non encore identifiés pourrait exister (Chichinadze et al., 2013; Lecuyer et al., 2007).

1) *Petits ARN centriolaires.*

Comme abordé à l'instant la présence d'ARN a été mise en évidence par différentes équipes et plus particulièrement la présence de petits ARN. Alliegro et collègues ont purifié 5 cnARN (ARN centriolaire), à partir de préparations de centrosomes purifiées à partir d'oocyte de mactre (*Spisula solidissima*) (Alliegro, 2008; Alliegro et al., 2006). Un seul de ces 5 cnARN (cnARN11) contient une phase ouverte de lecture pouvant coder une protéine, qui a été détectée par immunoblot. Les autres cnARN sont en revanche dépourvus de phase de lecture et sans homologie détectable avec des génomes connus. A noter que la séquence de cnARN11 contient des homologies de séquences avec une ARN-polymérase reverse du maïs (*Zea mays*) qui a été localisée au niveau du centrosome et dont l'expression serait régulée en fonction du cycle cellulaire (Alliegro, 2008). Ce résultat, s'il était confirmé, ouvrirait la voie à l'identification d'un système de réplication autonome propre au centrosome. Malgré ces résultats, l'existence de cnARN fait toujours l'objet de débats dans la littérature et des questions de spécificité de détection sont soulevées, laissant ainsi la question de la présence d'ARN centriolaire ouverte à discussion.

L'existence d'acides nucléiques centriolaire aussi bien dans des cellules de protozoaires ciliés que dans celles de mammifères fut suggérée par des travaux utilisant des agents intercalants sur des échantillons traités par différents types de nucléases. Le marquage détecté au niveau des centrioles était alors sensible au traitement par des RNAses mais pas par des DNAses (Dippell, 1976; McGill et al., 1976; Randall and Disbrey, 1965). Ces résultats suggéraient donc plutôt la présence d'ARN centriolaire. Des études plus récentes ont caractérisé certaines espèces spécifiques d'ARN centriolaires (cnARN) et d'ARNm qui seraient associés aux MT du cytosquelette (Alliegro, 2008; Sharp et al., 2011). Pour l'heure, la présence d'ARN au niveau des centrioles a été documentée chez 4 organismes eucaryotes indépendants : le mactre *Spisula solidissima* (Alliegro et al., 2006), le xénope (Blower et al., 2007), l'escargot *Ilyanassa* (Kingsley et al., 2007) et la drosophile (Lecuyer et al., 2007).

Mais depuis quelques années, l'avènement du séquençage et l'assemblage des génomes a permis d'identifier les acteurs qui sont conservés au cours de l'évolution des eucaryotes (O'Brien and Fraser, 2005). Dans le domaine des cils, la comparaison des séquences, l'étude des structures dans différents organismes modèles, les études de leurs compositions protéiques, placent le cil comme un organite commun à tous les eucaryotes analysés et présent déjà chez LECA pour assurer diverses

fonctions phares, dont la locomotion (Satir et al., 2008). Trois hypothèses sur l'origine ciliaire ont été émises :

2) Le modèle endosymbiotique (Sagan 1967)

Le modèle endosymbiotique propose que le cil soit apparu dans le cadre d'un mécanisme endosymbiotique avec un spirochète ou une archaebactérie. Cependant l'absence dans leurs génomes de composants du corps basal/cil a affaibli cette hypothèse qui fut pour un temps délaissée. Même en l'absence de données testables, cette théorie semble pourtant à nouveau revenir sur le devant de la scène avec la découverte des cnARN. Sous réserve que le rôle de ces ARN soit confirmé, le centriole pourrait être apparu par endosymbiose, à l'instar de la mitochondrie, et les cnARN seraient alors un vestige de cet événement. A noter toutefois que les séquences identifiées dans l'oocyte de mactre sont absentes des autres génomes pour lesquels nous disposons de données complètes de séquençage.

3) Le modèle d'infection virale (Satir et al., 2007)

Le modèle d'infection virale propose une origine virale à la création des cils. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'un virus à ARN disposant d'une symétrie d'ordre 9 aurait infecté une cellule, fournissant ainsi la structure de base du cartwheel. L'intégration de l'ARN viral dans le génome de la cellule aurait alors fourni l'ensemble de la machinerie permettant la synthèse de nouveaux centrioles. La multiplication et surtout la sortie des virus néosynthétisés passant par une voie d'exocytose, une première mutation affectant l'encapsulation du virus l'aurait bloqué sur la membrane plasmique. Dans un deuxième temps, le processus d'élongation des tubulines par la cellule hôte aboutissant à l'élongation de l'axonème se serait mis en place. Un tel phénomène d'élongation de certains mutants a déjà été observé chez le bactériophage (Kellenberger et al., 1965).

4) Hypothèse autogène (Pickett-Heaps, 1974)

L'hypothèse autogène proposée par Pickett-Heaps (Pickett-Heaps, 1974) postule un développement des corps basaux et du cil à l'aide de leurs éléments propres, sans recours extérieur. Cette organisation s'effectuerait grâce à un MTOC agissant sur les MT. La symétrie radiale d'ordre 9 apparaîtrait alors comme une optimisation de la motilité, des symétries d'ordre plus élevé étant dépourvues de motilité (Cavalier-Smith, 1978; Mitchell, 2004). De manière intéressante, les analyses génomiques indiquent que la plupart des composants des corps basaux n'ont d'équivalent ni chez les bactéries, ni chez les archaebactéries et ni chez les virus, mettant de la sorte en avant l'origine eucaryote de cet organelle (Carvalho-Santos et al., 2011). A noter qu'en revanche, des homologues de la tubuline existent bien chez les procaryotes (Lowe and Amos, 2009).

C. Classification des cils

Les cils sont habituellement classés en fonction de leur motilité. Cette caractéristique se superpose en général avec des caractéristiques structurales: une organisation « 9+0 » correspondant à des cils non-motiles et une organisation « 9+2 » à des cils motiles (Wheatley et al., 1996). Cette classification initiale des cils ne permet de prendre en compte toutes les situations (cf. figure 11), ce qui conduit à les classer plutôt en quatre groupes distincts :

- type « 9+2 motile » (cf. figure 11B): ce sont les cils motiles de l'épithélium mucocilié des voies respiratoires chez les mammifères, comme décrits par Sorokin (Sorokin, 1968). Chez les mammifères, on retrouve ce type de cils motiles à la surface des épendymocytes du plexus choroïde et des ventricules cérébraux ainsi qu'à la surface des cellules multiciliées des trompes de Fallope. On peut aussi distinguer les cils motiles des flagelles principalement en fonction de leur taille : le flagelle étant beaucoup plus long que le cil motile (Fawcett, 1981). Cependant, en raison de leur structure de type « 9+2 », et du fait de l'existence d'une machinerie IFT commune, ils sont généralement considérés comme structurellement semblables (Rosenbaum et al., 1999; Silverman and Leroux, 2009; Snow et al., 2004).
- « 9+0 motile » : le cil nodal présente la caractéristique d'un axonème motile en dépit de l'absence de bras de dynéines, de structures radiales, et de paires centrales de MT (Bellomo et al., 1996). La présence de dynéines particulières dans ce type de cils expliquerait leur motilité (Olbrich et al., 2002).
- « 9+2 sensoriel » : Ces structures ciliaires sont retrouvées sur la face apicale des cellules sensorielles cochléaires et vestibulaires. Au nombre de 150 environ par cellule, ces structures sont appelées « stéréocils » bien qu'ils ne soient pas des cils à proprement parlé car ils sont constitués de 3 000 filaments axiaux d'actine et sont reliés par des ponts de fibrine qui en assurent la rigidité. Leur assemblage constitue la touffe ciliaire. Les stéréocils se disposent différemment selon le type de cellules ciliées, dessinant un « W » sur les cellules ciliées externes, alignés en une rangée, en palissade, sur les cellules ciliées internes. Ils jouent un rôle essentiel dans la transduction mécano-électrique du signal acoustique ou du mouvement. Au milieu de ces stéréocils, on retrouve un cil unique : le kinocil. Il est plus long que les stéréocils et est composé d'un axonème de MT avec une paire de MT centraux (cf. figure 12). Par ailleurs, au niveau de l'épithélium olfactif, un autre type de cils appelés « cils olfactifs » se retrouvent au nombre de 6 à 8 à l'extrémité de chaque dendrite des cellules olfactives. Ces cils ont une structure atypique « 9+2 » non-motile avec une longueur d'environ 200 µm. Ces cils olfactifs constituerait le composant

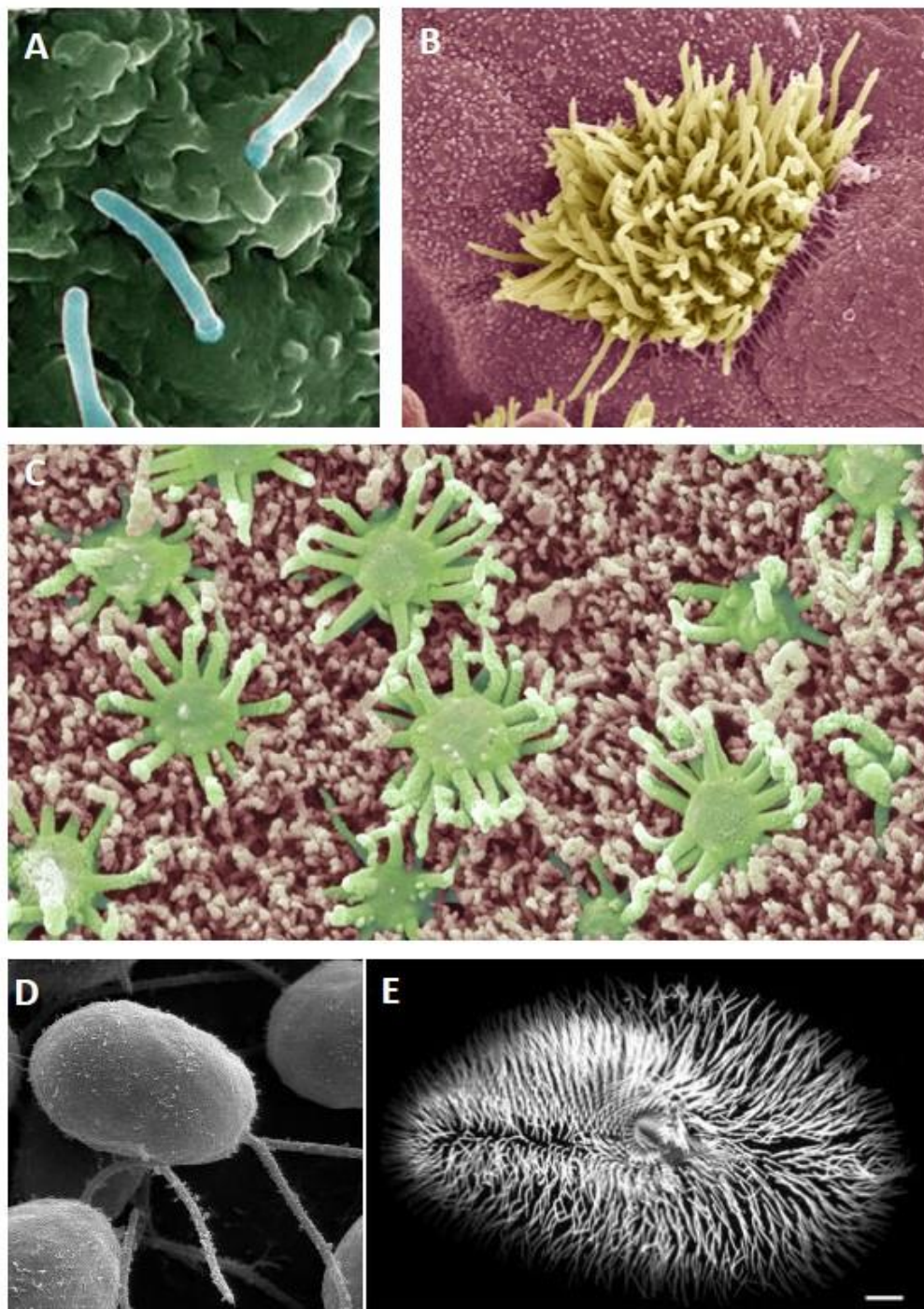


Figure 11 : Les cils chez l'homme et certains organismes modèles

Photos de microscopie électronique des différents cils retrouvés chez l'homme (A, B et C) ainsi que chez *Chlamydomonas* et chez la paramécie.

- A. Cil primaire (Reiter Laboratory)
- B. Cellules multiciliées retrouvées dans les voies respiratoires, les trompes de Fallope ainsi que dans les épendymocytes (Steve Gschmeissner),
- C. Cellules multiciliées retrouvées dans les cellules olfactives (Steve Gschmeissner)
- D. Flagelles de *chlamydomonas*
- E. Cils motiles présents chez la paramécie

essentiel de l'organe olfactif où se ferait la détection par des récepteurs spécifiques des substances odorantes (Fawcett, 1981).

- « 9+0 sensoriel » : retrouvés dans les cils sensoriels de l'œil (les cônes) et du rein (Seeley and Nachury, 2010).
- Le cil primaire « 9+0 » (cf. figure 11A): Le cil primaire est retrouvé dans la quasi-totalité des cellules du corps humain à l'exception de quelques cellules spécialisées. Par exemple, dans les cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire humain, le cil primaire disparaît au profit des cils motiles au cours de la différenciation des cellules multiciliées (Jain et al., 2010). Le cil primaire est du type « 9+0 » non-motile avec une absence de bras de dynéines. Dans la cellule, cette organelle forme une expansion de la membrane cytoplasmique en contact avec l'extérieur de la cellule. De manière générale, on l'observe dans les cellules quiescentes où sa biogénèse est étroitement associée au cycle cellulaire. En effet, lors de l'entrée en cycle, le cil primaire se désassemble (pour revue (Seeley and Nachury, 2010)). Longtemps considéré comme une structure vestigiale dénuée de tout intérêt, certaines propriétés du cil primaire découvertes lors des dernières années l'ont notamment impliqué dans de nombreuses pathologies humaines. Les recherches très actives qui le concerne s'expliquent du fait de son rôle central dans le contrôle de nombreuses voies de signalisation : Notch (Ezratty et al., 2011), TOR, Wnt, mais surtout Shh (Sonic hedgehog). De nombreuses études indiquent la présence d'acteurs centraux de ces voies de signalisation au niveau du cil primaire, et cette localisation spécifique apparaît indispensable à la fonction correcte de ces voies. De plus, des défauts de cils primaires ont un impact sur ces voies de signalisation, qui aboutissent à des défauts touchant de nombreux processus développementaux, lors de pathologies regroupées sous le terme de ciliopathies (cf. partie II. 3) (Berbari et al., 2009; Gerdes et al., 2009; Goetz and Anderson, 2010; Wheatley et al., 1996).

L'objet de mon travail de thèse portant particulièrement sur l'étude des mécanismes contrôlant la biogénèse des cils motiles, je ne détaillerai pas davantage le cil primaire. La prochaine partie sera consacrée à la description des différents modèles expérimentaux de la multiciliogenèse.

II. Les organismes multiciliés

Les cils motiles sont présents chez la plupart des espèces animales, y compris chez de nombreux organismes invertébrés : protozoaires ciliés (e.g. paramécie, *Tetrahymena*), planaires (e.g.

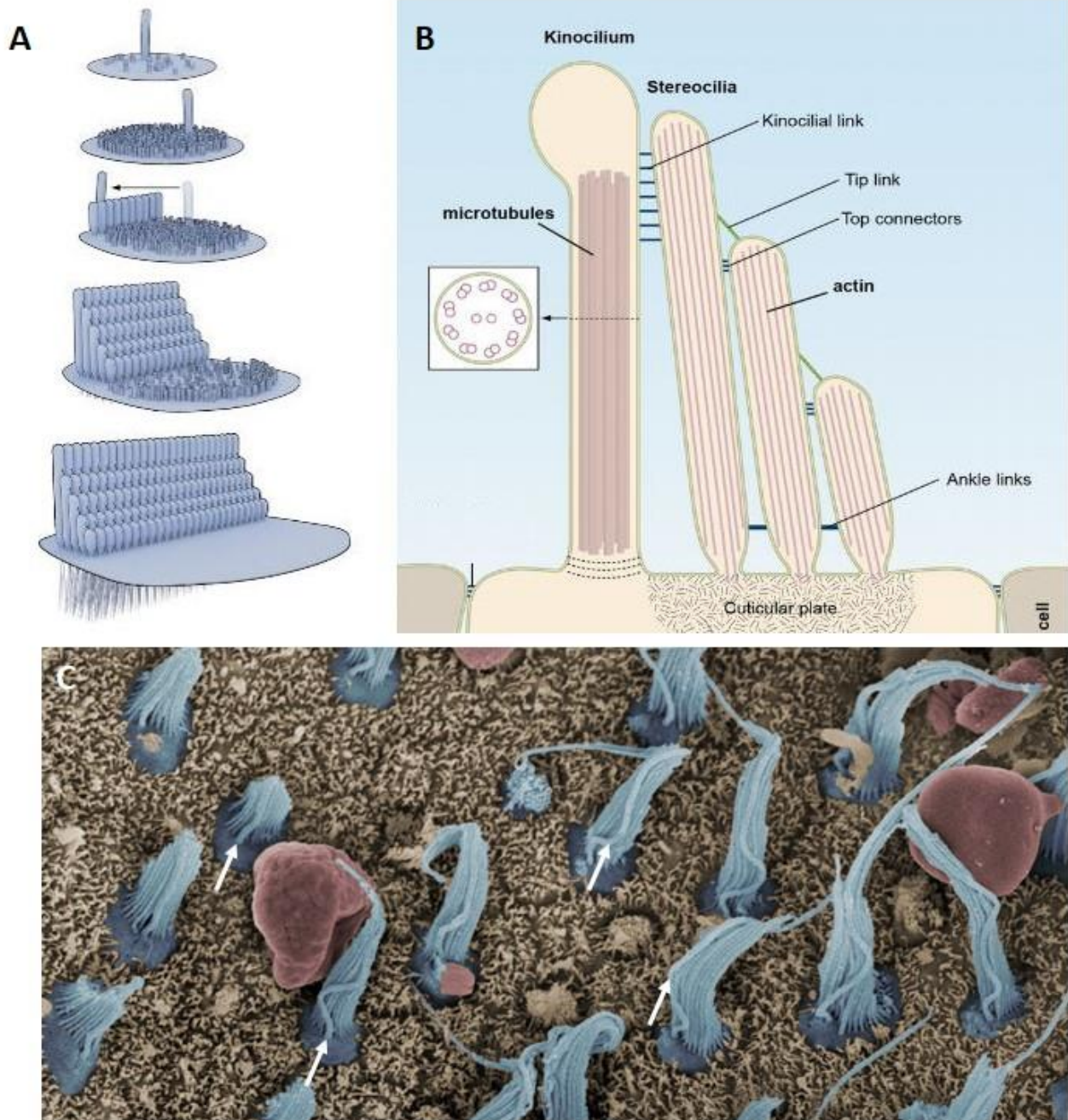


Figure 12: Structure et développement des cellules ciliées de l'oreille interne

A. Diagramme représentant les différentes étapes de la formation des cellules ciliées de l'oreille interne. La formation des cellules ciliées de l'oreille interne s'initie par la formation d'un cil appelé le kinocil. Par la suite une multitude de microvillosités se forment autour du kinocil aboutissant à l'apparition de rangées de stéréocils. Ces stéréocils sont constitués d'actine et ne sont donc pas considérés comme de véritables cils. Le kinocil est situé sur le front de ces rangées de stéréocils (20 à 300 par cellules) et le mouvement des rangées de stéréocils permet le rapprochement ou l'éloignement par rapport au kinocil induisant des phénomènes de polarisation/dépolarisation de la cellule, conduisant *in fine* à la modulation du signal nerveux. (Schwander et al., 2010)

B. Schéma représentant une vue en coupe des cellules ciliées de l'oreille interne (Schwander et al., 2010).

C. Acquisition en microscopie électronique des cellules ciliées de l'oreille interne, avec indiqué par une flèche blanche le kinocil situé sur le front des rangées de stéréocils.

vers aquatiques plats comme *Schmidtea mediterranea*, *Platynereis dumerilii*), larve d'oursin de mer, algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*). Ces modèles très utilisés en biologie du développement (evo/devo) ont permis d'augmenter de façon importante les connaissances des mécanismes mis en jeu dans le processus de ciliogénèse.

Les cils motiles sont conservés chez les vertébrés où ils sont retrouvés dans certains tissus spécifiques propres aux différentes espèces, ce qui a permis le développement de plusieurs modèles d'étude. Nous décrivons ici quelques modèles qui sont actuellement parmi les plus utilisés, et qui sont dérivés de l'Homme, de la souris du rat, du xénope ou du poisson zèbre. Mon travail de thèse s'est notamment focalisé sur deux modèles distincts de ciliogénèse : l'épithélium respiratoire humain et l'épiderme d'embryon de xénope. De ce fait, ces deux modèles seront plus particulièrement détaillés par la suite (cf. partie II. 3. B).

1. Les épithéliums multiciliés chez l'Homme

Les cellules épithéliales multiciliées présentent à leur surface des centaines de cils motiles. Chez tous les mammifères, on retrouve un épithélium multicilié au niveau de la paroi des ventricules cérébraux où grâce aux épendymocytes multiciliés, ils participent à la circulation du liquide céphalo-rachidien (Shuangshoti et al., 1979). Au niveau du tractus génital féminin, leur présence dans les trompes de Fallope contribue au transport de l'ovule jusqu'à l'utérus (Mardh et al., 1976; Westrom et al., 1977). Nous verrons aussi que les voies respiratoires sont tapissées d'un épithélium mucocilié qui est indispensable à la mise en place de l'escalator mucociliaire utile à l'évacuation du mucus et des particules inhalées, contribuant ainsi à la première ligne de défense du tissu respiratoire (Barton and Lourenco, 1973).

A. Plexus choroïde et parois ventriculaires cérébrales

Le Liquide céphalo-rachidien (LCR) transporte les nutriments nécessaires et les métabolites produits durant un fonctionnement normal du système nerveux central. Sa production provient principalement des cellules épithéliales du plexus choroïde. Ces dernières possèdent des cils primaires et jouent le rôle de véritable senseur du LCR : elles permettent l'homéostasie du LCR en régulant la production et la composition chimique du LCR en fonction du niveau de différents facteurs circulants.

Les épendymocytes sont des cellules gliales cylindriques multiciliées et polarisées qui forment un tissu dit « pseudoépithélial » dotés de cils motiles et de jonctions cellulaires. Leur origine embryonnaire est différente des cellules épithéliales puisqu'elles proviennent de la crête neurale (Mardh et al., 1976). Le « flux épendymaire » du LCR est assuré grâce au battement des cils motiles

présents sur les épendymocytes (Del Bigio, 1995). La présence de cellules multiciliées épendymales a été observée dans les zones ventriculaires de nombreux vertébrés : poissons, reptiles, oiseaux (Garcia-Verdugo et al., 2002; Kishimoto and Sawamoto, 2012) mais aussi souris et homme. Les cils motiles des cellules épendymales sont de type « 9+2 ». De manière surprenant le battement ciliaire des cellules épendymales a été montré comme nécessaire pour la migration des neurones (Sawamoto et al., 2006).

B. Les trompes de Fallope

Chez l'Homme, et de manière plus générale chez les mammifères, un épithélium mucociliaire, composé de cellules multiciliées et de cellules sécrétrices de mucus tapissent la lumière de l'oviducte (appelé aussi trompes de Fallope) (Jansen, 1978). On divise habituellement la trompe de Fallope en 4 parties distinctes : à partir de l'ovaire, la *fimbria*, l'*infundibulum*, l'*ampulla* et l'*isthmus*, ce dernier étant en contact avec l'utérus (cf. figure 13). La lumière de ces 4 parties est couverte d'un épithélium pseudo-stratifié simple. Environ 50% des cellules sont multiciliées au niveau de la fimbria pour décroître à environ 30% au niveau de l'isthmus. Les cellules épithéliales restantes correspondent essentiellement à des cellules sécrétrices de mucus. La détection récente d'autres cellules, correspondant probablement à des cellules basales, établit un parallèle avec l'organisation observée dans le tissu respiratoire, et confère à ces dernières cellules un rôle de cellules progénitrices lors de la régénération de l'épithélium de l'oviducte (Paik et al., 2012).

Le battement ciliaire permet le déplacement et la migration de l'ovule dans les trompes de Fallope jusqu'au lieu de nidation. A noter toutefois que les cils ne sont pas indispensables à ce processus, la contraction musculaire en étant le principal vecteur. De fait, certaines femmes atteintes de syndromes associés à une immobilité ciliaire parviennent à poursuivre jusqu'à son terme leur grossesse, sans problème d'implantation de l'embryon (McComb et al., 1986). Par analogie avec l'épithélium respiratoire humain, un rôle de protection et/ou d'évacuation du mucus serait donc associé à cet épithélium multicilié.

L'épithélium de l'oviducte contient également des cellules sécrétrices de mucus, qui possèdent un cil primaire de type « 9+0 » (Hagiwara et al., 2008). Un rôle potentiel de régulateur de la sécrétion de mucus en réaction à la composition du fluide a été proposé pour ce dernier (Hagiwara et al., 2008).

2. Les voies respiratoires

A. Structure anatomique

L'appareil respiratoire des mammifères terrestres est divisé en 2 parties distinctes (Crystal, 1997; Fawcett, 1981; Hajj, 2006; Roux, 2010). Chez l'homme, on décrit :

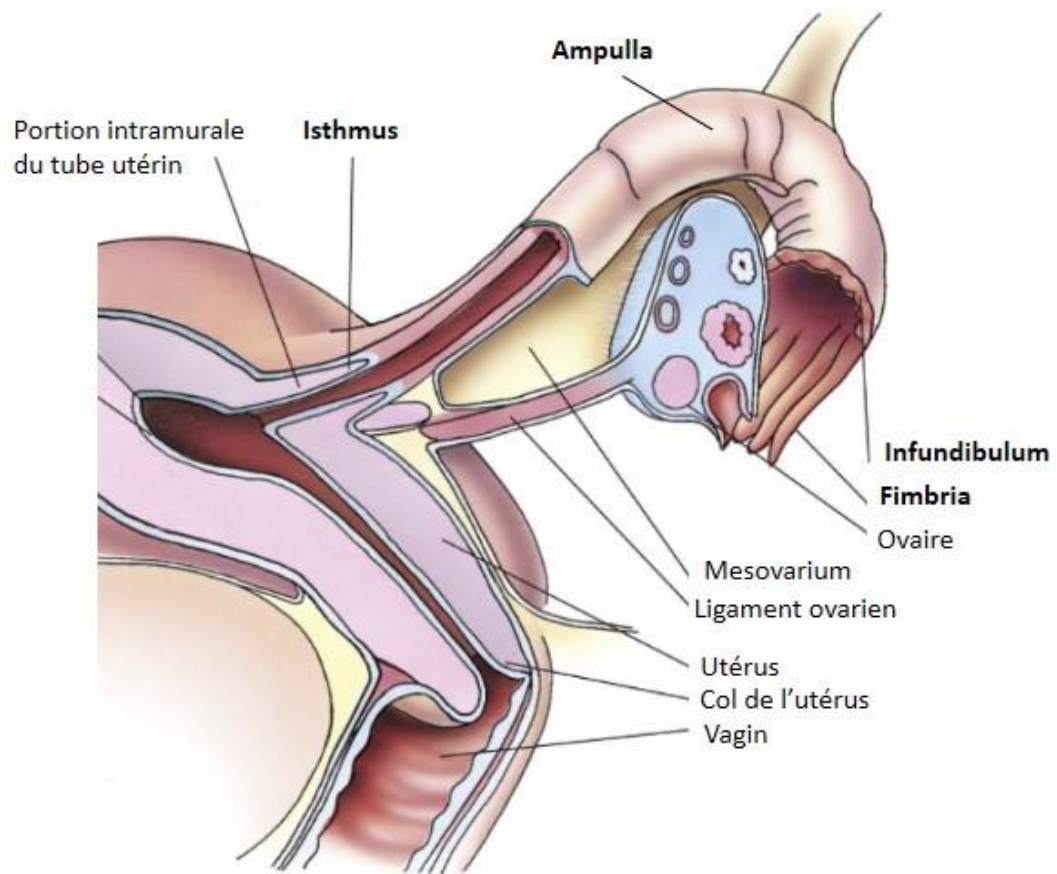


Figure 13: Structure des trompes de Fallope

D'après *Concise Histology* 1st edition, Leslie P. Gartner and James L. Hiatt

- Les voies aériennes supérieures (aussi appelées voies extra-pulmonaires) qui regroupent les cavités nasales, les sinus, le rhino-pharynx et le larynx. Cette partie haute des voies respiratoires joue un rôle de convecteur afin de réchauffer et d'humidifier l'air inspiré et d'éviter le dessèchement de la muqueuse respiratoire au cours de l'inspiration.

- L'arbre respiratoire, constitué de la trachée, des bronches, et qui aboutit aux alvéoles pulmonaires. Trachée et bronches assurent la conduction de l'air. L'arbre est constitué par environ 23 divisions successives, dichotomiques et asymétriques. La première génération divise la trachée en bronches souches droite et gauche qui pénètrent dans chacun des deux poumons. Elles se ramifient ensuite en bronches lobaires au niveau de chaque lobe pulmonaire. Les générations suivantes de bronches se ramifient de manière dichotomique en bronches segmentaires (de la 2^{ième} à la 8^{ième} génération), puis en petites bronches, pour aboutir enfin aux bronchioles (de la 9^{ième} à la 14^{ième} génération) et aux bronchioles terminales (de la 15^{ième} à la 19^{ième} génération), constituant la fin des voies de conduction aériennes. Enfin, les alvéoles pulmonaires naissent des bronchioles terminales (de la 20^{ième} à la 23^{ième} génération) (cf. figure 14). La fonction essentielle de la partie distale de l'appareil respiratoire concerne l'échange entre l'air inspiré, enrichi en oxygène et l'air expiré, enrichi en dioxyde de carbone.

B. Architecture histologique

Les voies respiratoires humaines sont tapissées d'un épithélium dont l'organisation morphologique, la composition cellulaire et les propriétés diffèrent en fonction de sa position dans l'arbre respiratoire (Breeze and Wheeldon, 1977).

Depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles, l'épithélium respiratoire comprend un épithélium de surface, en contact direct avec l'air inhalé, et un épithélium glandulaire, situé dans la sous-muqueuse respiratoire et relié à la lumière des voies aériennes par des canaux collecteurs abouchant en surface au niveau de la lumière canalaire. Les glandes sous-muqueuses sont constituées d'un canal ciliaire, de canaux collecteurs, de tubules et *acini* muqueux, et d'*acini* séreux (Meyrick et al., 1969; Pastor et al., 1994). On estime à 4000 le nombre des glandes présentes dans la trachée adulte humaine (Tos, 1966).

L'épithélium naso-trachéo-bronchique de surface est dit pseudostratifié car, bien que les noyaux des cellules présentent un aspect stratifié, ces dernières sont toutes en contact avec la lame basale, qu'elles atteignent ou non la surface des voies aériennes (McDowell et al., 1978).

Mon travail expérimental ayant principalement porté sur la muqueuse nasale ou bronchique humaine, isolées à partir de biopsies de patients, ainsi qu'à la muqueuse trachéale murine isolée après

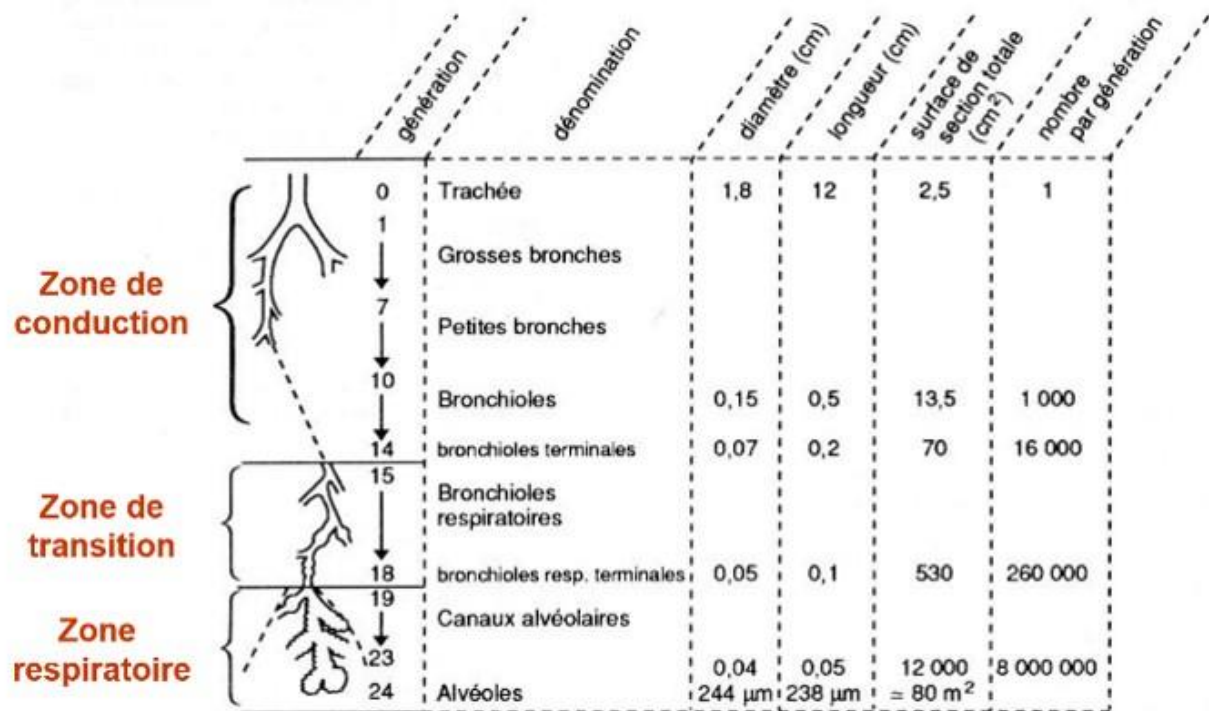


Figure 14: Structure anatomique de l'arbre respiratoire

(Selon "l'essentiel en physiologie respiratoire" de Ch. Préfaut chez Sauramps Médical 1988)

dissection de trachée de souris, je ne détaillerai dans cette partie les différents aspects anatomiques, histologiques et cellulaires que pour ces différents modèles.

C. Les muqueuses nasales

Les deux fosses nasales (gauche et droite) sont séparées par une cloison osseuse. Elles constituent l'orifice supérieur de l'appareil respiratoire, situées entre narine et choane. Elles contiennent un vestibule, situé sous les ailes du nez, puis les fosses nasales. Elles contiennent également les sinus (maxillaires, éthmoïdaux, frontaux, sphénoïdaux) qui sont des cavités pneumatiques creusées dans les os de la face (cf. figure 15). Les sinus sphénoïdaux, dans le corps du sphénoïde, débouchent dans les fosses nasales au niveau des méats, situés sous des replis des parois latérales appelés cornets. On dénombre trois cornets nasaux : supérieur, moyen et inférieur. Ce dernier, le plus développé, est constitué d'un os propre. Ces cornets permettent d'augmenter la surface de contact, puisque ainsi les deux fosses développent une surface de 160 cm^2 , pour un volume de seulement 20 cm^3 .

Au niveau des cavités nasales il existe trois types de muqueuses :

- Une muqueuse respiratoire (Crystal, 1997; Harkema, 1991), qui fait l'objet de notre étude. Elle est composée d'un épithélium pseudostratifié constitué en majorité de cellules multiciliées, de cellules basales, de cellules sécrétrices de mucus et de quelques cellules neuroendocrines (Jornot et al., 2007; Jornot et al., 2008) (cf. partie II. 2. I). Cet épithélium repose sur une lame basale et un chorion. Le chorion est un tissu conjonctif, très vascularisé et innervé, qui contient des tissus lymphoïdes associés, et de nombreuses glandes sous-muqueuses, exocrines et tubulo-acineuses incluant des glandes séreuses (qui sécrètent des solutions protéiques), des glandes muqueuses (qui sécrètent les mucines qui correspondent au constituant principal du mucus), et des glandes séro-muqueuses ou mixtes. Les glandes séreuses sont abondantes dans les fosses nasales mais rares dans les sinus nasaux.
- Une muqueuse olfactive, composée d'un épithélium neuro-sensoriel responsable de l'olfaction et composée de cellules multiciliées non motiles.
- Une muqueuse vestibulaire, qui assure une continuité avec la couverture cutanée externe, composée d'un épithélium épidermoïde pavimenteux stratifié, non kératinisé et résistant aux agressions physiques auxquelles l'expose sa position à l'entrée de l'axe aérien.



Figure 15: Structure anatomique des fosses nasales
 (Selon l'“Atlas de l'anatomie humaine”, de FH Netter, 1997)

D. La muqueuse du pharynx

Le pharynx, localisé à un carrefour aéro-digestif, et constitué d'une armature musculo-membraneuse recouverte de muqueuse, se décompose en 3 parties :

- le rhinopharynx, uniquement en contact avec l'air, contient une muqueuse de type respiratoire, comme on en trouve tout au long des voies de conduction. Sa structure est identique à celle que nous avons vue au niveau des fosses nasales, excepté au niveau du chorion qui ne présente pas d'hypervascularisation.
- l'oropharynx, en contact avec l'air (axe aérien) mais aussi avec le bol alimentaire (axe digestif). La muqueuse de l'oropharynx est constituée d'un épithélium de type épidermoïde, beaucoup plus résistant que l'épithélium respiratoire, comme on en trouve dans la partie haute du tube digestif (cavité buccale, langue et œsophage).
- le laryngopharynx, cette partie du pharynx faisant partie du tube digestif, sa muqueuse est en prolongement avec la muqueuse œsophagienne.

Les structures lymphoïdes surdéveloppées au niveau du pharynx forment des structures lymphoïdes secondaires appelées « amygdales ».

E. La muqueuse du larynx

Le larynx participant à la fois à l'axe aérien et à la phonation dispose d'une structure histologique adaptée à ces deux fonctions. Comme le pharynx, il est composé d'une armature fibro-musculo-cartilagineuse recouverte de muqueuses. Le larynx faisant partie des voies aériennes, il est tapissé d'une muqueuse respiratoire, sauf en deux endroits, au niveau desquels l'épithélium respiratoire, trop fragile, ne pourrait persister :

- La face supérieure de l'épiglotte qui appartient à l'axe digestif, puisque lors de la déglutition, après occlusion de l'orifice aérien, elle se trouve dans le prolongement de la base de la langue, en amont, et de l'œsophage en aval.
- Les cordes vocales qui sont des expansions de la muqueuse laryngée formant 2 paires de replis : Les plis supérieurs ou plis vestibulaires (fausses cordes vocales) qui sont protégés des fortes pressions induites par la phonation. Ces plis ne nécessitant pas de protections particulières sont recouverts d'un épithélium prismatique, pseudostratifié, multicilié, mais présente quelques îlots d'épithélium épidermoïde. En revanche, les plis inférieurs ou plis vocaux proprement-dit, soumis aux contraintes de la phonation, sont recouverts d'un épithélium de type épidermoïde plus résistant, ainsi qu'un chorion sous-jacent particulier, occupé par un ligament, le ligament vocal et par un muscle strié, le muscle vocal. Il est mal vascularisé et ne dispose pas de glandes.

F. La muqueuse bronchique

Les voies aériennes bronchiques sont recouvertes d'une muqueuse respiratoire, très proche de la muqueuse respiratoire des cavités nasales. Elle est constituée d'un épithélium de revêtement (ou de surface), pseudostratifié reposant sur une lame basale et un chorion sous-jacent. On distingue l'épithélium de revêtement localisé à la surface des voies respiratoires, en contact direct avec l'air inspiré de l'épithélium glandulaire, situé dans la sous-muqueuse. De nombreuses glandes sécrétrices sont localisées entre l'épithélium respiratoire bronchique et le chorion, dont l'activité sécrétoire est contrôlée par de nombreux médiateurs (Quinton, 1981). Elles sont formées d'un épithélium glandulaire sécréteur d'un fluide biologique riche en mucus et en molécules antimicrobiennes (Bals et al., 1998; Basbaum et al., 1990; Jeffery, 1983). Ces glandes sous-muqueuses sont composées de tubules et *acini* séreux, muqueux ou séro-muqueux, de tubules interconnectés et de canaux collecteurs (Meyrick et al., 1969). Les produits de sécrétion (mucus) s'accumulent au sein des canaux collecteurs, pour être sécrétés au niveau de la lumière des voies aériennes après passage par des canaux ciliaires bordés d'un épithélium cylindrique multicilié (cf. figure 16).

- L'épithélium de surface est constitué en majorité de cellules multiciliées, de cellules basales, de cellules intermédiaires et de cellules caliciformes disséminées (cf. partie II. 2. I). La présence de nombreuses cellules multiciliées au niveau des conduits respiratoires est indispensable pour une propulsion efficace de la couche de mucus produit à la fois par les cellules sécrétrices de surface et par les glandes intra-épithéliales (muco-séreuses). L'épaisseur de l'épithélium de surface diminue au fur et à mesure de la descente dans l'arbre bronchique. Cet amincissement est associé à une diminution progressive du nombre de cellules multiciliées et de cellules sécrétrices de mucus au profit d'un autre type cellulaire, les cellules club (anciennement dénommées cellules de Clara).

- L'épithélium glandulaire est caractérisé par la présence d'une majorité de cellules sécrétrices : les cellules à mucus et les cellules séreuses constituant respectivement 40 % et 60 % de la population totale. Les cellules à mucus contiennent de nombreuses granules de sécrétion. Ces vésicules, d'un diamètre variant de 300 à 1800 nm, sont remplies de mucines. Ces cellules permettent la sécrétion du mucus et sont localisées dans la partie proximale de la glande. Les cellules séreuses sont les cellules les plus distales de la glande. Elles sont impliquées dans la sécrétion d'eau et d'électrolytes et contiennent aussi au pôle apical de nombreux granules denses aux électrons, des vésicules sécrétoires de 300 à 1000 nm de diamètre, contenant de nombreuses macromolécules dont le lysozyme, la lactoferrine, des IgA sécrétoires ainsi que la peroxydase (Basbaum et al., 1990; Meyrick and Reid, 1970) (cf. partie II. 2. J. 4)).

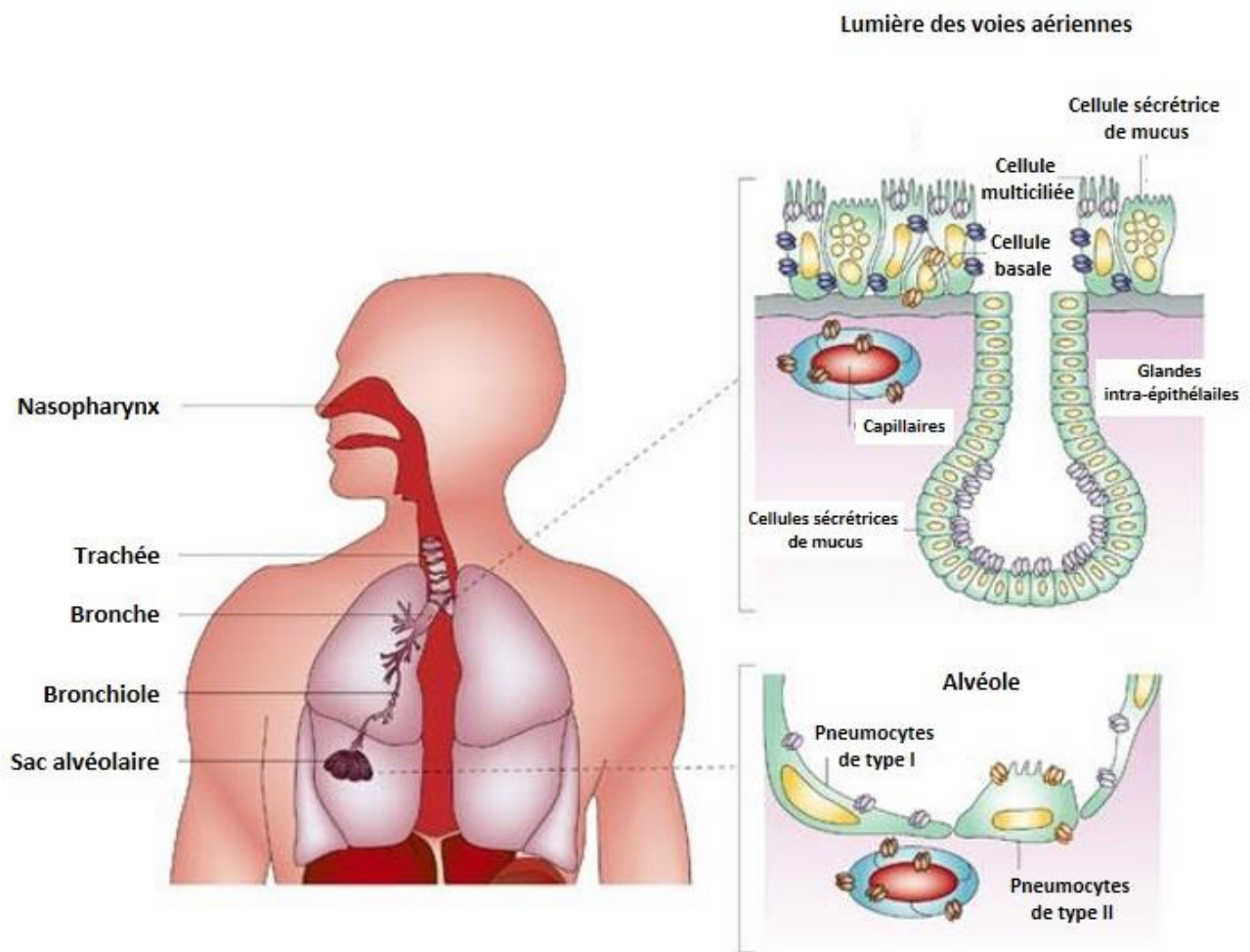


Figure 16: Structure anatomique de la muqueuse bronchique (d'après King et al., 2004)

L'épithélium de surface bordant les voies respiratoires est composé par des cellules multiciliées, des cellules sécrétrices de mucus et des cellules basales. Des glandes intra-épithéliales sont dispersées le long de cet épithélium. On y retrouve une majorité de cellules sécrétrices de mucus.

Les alvéoles sont composées de pneumocytes de type I et de type II.

G. L'épithélium bronchiolaire

Au niveau des bronchioles, l'épithélium bronchiolaire ne présente plus qu'une à deux couches de cellules. Comme ci-dessus, cet épithélium est constitué de cellules cylindriques, mais les cellules multiciliées alors présentes sont moins hautes, et les cellules basales sont beaucoup moins nombreuses. L'épithélium bronchiolaire est dépourvu de cellules caliciformes, remplacée par les cellules Club, et une présence accrue de cellules neuro-endocrines (Cutz et al., 1985).

- Les cellules de Club ou cellules bronchiolaires non-ciliées sont des cellules en dôme, de forme ovale ou cuboïdales chez l'homme, mais irrégulière chez les autres espèces (Plopper, 1983; Plopper et al., 1983). Leur nombre augmente au fur et à mesure des segmentations des voies aériennes bronchiolaires. Leur pôle apical faisant saillie dans la lumière bronchiolaire est bordé de microvillosités irrégulières et contient des grains de sécrétion de 300 à 600 nm de diamètre (Singh and Katyal, 2000). Elles possèdent un noyau en position basale, leur cytoplasme est riche en glycogène et en cytochromes P450, qui sont des enzymes impliquées dans la détoxification des xénobiotiques (Castell et al., 2005; Widdicombe and Pack, 1982). Les cellules Club sont impliquées dans : (1) la synthèse et la sécrétion du CC10 (Club Cell protein 10 Kda) ou CCSP (Club Cell Secretory Protein) qui joue un rôle anti-inflammatoire en tant qu'inhibiteur de la phospholipase A2 (Mantile et al., 1993; Miller et al., 2007a; Miller et al., 2007b; Singh and Katyal, 1997; Stripp et al., 2000; Watson et al., 2001) ; (2) elles participent à la protection des voies respiratoires distales *via* leur capacité de détoxification des substances xénobiotiques et des gaz irritants inhalés (Stripp and Reynolds, 2008) ; (3) elles sécrètent enfin l'antileucoprotéase (De Water et al., 1986; Willems et al., 1988) et les protéines A et B du surfactant alvéolaire, et sont connues pour leur capacité d'échanges ioniques (Van Scott et al., 1987). Certains auteurs les définissent comme cellules progénitrices ou cellules souches de l'épithélium bronchiolaire, capables en cas de lésion de proliférer pour reconstituer un épithélium jointif (Emura, 1997).

- Les cellules neuroendocrines, ou cellules à granules denses, ou cellules de Kultchitsky, ou cellules de Feyrter, ont été identifiées dans l'épithélium respiratoire de surface par microscopie optique. Ces cellules ont longtemps été considérées d'origine ectodermique, issues de la crête neurale ; elles proviennent en réalité de l'endoderme du bourgeon pharyngien et représentent donc une sous-population de cellules épithéliales (Warburton et al., 1998). Distribuées de façon éparse le long de l'épithélium des voies aériennes (Adriaensen and Scheuermann, 1993), elles se regroupent particulièrement au niveau bronchiolaire où elles forment des corps neuroépithéliaux (Linnoila, 2006). Leur forme pyramidale ou triangulaire est proche de celle des cellules basales, et elles sont toutes positionnées au contact de la lame basale. Chez l'homme, une étude très récente montre que les cellules neuroendocrines ont une forme de bouteille, d'une hauteur moyenne de 50 µm, leur corps

cellulaire se situant au niveau basal en contact avec la lame basale avec un prolongement du cytoplasme qui atteint la surface de l'épithélium respiratoire (Weichselbaum et al., 2005). Elles peuvent être distinguées par le profil d'expression de molécules biologiquement actives comme la sérotonine, la calcitonine, le CGRP (calcitonin gene-related peptide), la chromogranine A, la GRP, (gastrin related peptide), la BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et la bombésine, cette dernière étant impliquée dans le tonus vasculaire et musculaire bronchique, ainsi que dans la sécrétion du mucus et l'activité ciliaire (Polak and Bloom, 1986; Wharton et al., 1978a; Wharton et al., 1978b). Les peptides sécrétés par les cellules neuroendocrines jouent un rôle déterminant dans le développement fœtal et dans la morphogenèse pulmonaire (Li et al., 1994; Sunday et al., 1990). En outre, les cellules neuroendocrines interviendraient dans la réparation et la régénération de l'épithélium bronchiolaire lésé, et pourraient représenter un réservoir de cellules souches/progénitrices au niveau bronchiolaire (Reynolds et al., 2000).

H. L'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est constitué de deux types de cellules: les pneumocytes I (PNI) et les pneumocytes II (PNII) (cf. figure 16). Les alvéoles sont recouvertes par une fine pellicule de surfactant contenant 85-90% de lipides, 10% de protéines et 2% de carbohydrates. Les principales protéines du surfactant sont SP-A et SP-D qui sont hydrosolubles, SP-B et SP-C qui sont hydrophobes et spécifiques du poumon (SP pour surfactant protein). Le surfactant maintient la valeur de la tension de surface afin d'empêcher le collapsus de l'alvéole, cette fonction étant principalement assurée par les polypeptides SP-B et SP-C (Johansson et al., 1992; Tafel et al., 2008). Le surfactant joue également un rôle dans la défense immunitaire du poumon *via* certains de ses composants qui peuvent stimuler la phagocytose et la capacité de dégradation et de migration des macrophages alvéolaires (Hoffman et al., 1987; O'Neill et al., 1984).

1) Les pneumocytes I

Bien que les PNI couvrent 95% de la surface alvéolaire environ (5100 μm^2 environ), ils ne représentent que 37% de la population épithéliale alvéolaire du fait de leur forme aplatie. Ils possèdent peu d'organelles intracellulaires, témoignant ainsi d'une activité métabolique peu intense (Mercurio and Rhodin, 1976). Leur extrême finesse (0,1 à 0,5 μm d'épaisseur) permet d'expliquer un rôle important des PNI dans les échanges gazeux. Par ailleurs, la présence à leur surface membranaire de transporteurs et de canaux perméables au sodium (Na^+/K^+ -ATPase et ENaC), indiquent aussi un rôle dans le transport d'eau et d'électrolytes (Borok et al., 2002; Dobbs et al., 1998; Johnson et al., 2002)

et notamment dans l'absorption (Fang et al., 2002). Les PNI sont des cellules en phase de différenciation terminale, sans capacité de prolifération.

2) *Les pneumocytes II*

Les PNII, de morphologie plus cuboïdale, n'occupent que 5% de la surface alvéolaire tout en constituant 63% de la population épithéliale alvéolaire, avec un volume moyen qui vaut la moitié de celui du PNI (750 μm^3 environ) (Crapo et al., 1982; Fehrenbach et al., 1995). Ils sont retrouvés dans les coins des septa alvéolaires et sont partiellement recouverts par des expansions cytoplasmiques des PNI auxquels ils sont liés par des jonctions intercellulaires (Castranova et al., 1988). Ils sécrètent le surfactant pulmonaire (Vallyathan et al., 1988). Cette grande activité de sécrétion est associée à la présence de corps lamellaires, organes de stockage du surfactant (Castranova et al., 1988). Les PNII ont également un rôle de cellules progénitrices, capables de générer des PNI. Les PNI et les PNII possèdent, tout comme les cellules de l'épithélium bronchique, de nombreux canaux ioniques (cf. partie II. 2. J. 2)) leur permettant de réguler le transport hydro-électrolytique transalvéolaire (Barbry and Hofman, 1997; Barbry and Lazdunski, 1996; Matthay et al., 1996; Matthay et al., 2005; Voilley et al., 1997).

I. Les différents types cellulaires de l'épithélium respiratoire des voies aériennes supérieures.

L'appareil respiratoire est recouvert par un épithélium pseudo-stratifié dont les proportions et les types cellulaires varient en fonction de sa localisation dans les voies respiratoires (Breeze and Wheeldon, 1977; Busuttil et al., 1977; Serafini and Michaelson, 1977). Cette description se limitera aux types cellulaires présents dans les voies aériennes supérieures, qui sont celles sur lesquelles a porté mon travail expérimental.

1) *Les cellules multiciliées*

Les cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire ont une forme cylindrique ou pyramidale, d'une hauteur d'environ 20 μm , pour une largeur variant de 7 μm (du côté apical) à 2 μm (à la base de la cellule) (Breeze and Wheeldon, 1977). Le battement coordonné de centaines de cils vibratiles à leur surface permet d'assurer la fonction de clairance mucociliaire. Chaque cellule multiciliée arbore à son pôle apical 200 à 300 cils motiles (Rhodin, 1966) dotée d'un axonème d'une longueur d'environ 7 μm de long et dont le diamètre moyen est de 0,25 μm environ. Des analyses en microscopie électronique chez la souris indique que la longueur du cil diminue en descendant dans l'arbre bronchique : de 7 μm de long dans les zones supérieures de conduction, les cils ne mesurent plus qu'environ 3 à 4 μm dans les bronches (Greenwood and Holland, 1972). La couche de cellules multiciliées repose sur une

membrane basale de 40 à 60 nm d'épaisseur. Ce sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium de surface (cf. figure 16) : elles représentent au niveau de la trachée ou des bronches plus de 56 % de la population cellulaire et ne représentent plus que 15% des cellules épithéliales dans les voies respiratoires plus distales (Serafini and Michaelson, 1977). Malgré ces différences de proportion, les structures des cellules multiciliées restent relativement constantes entre espèces, de même qu'au sein d'une même espèce au long de l'appareil respiratoire (Breeze and Wheeldon, 1977; Busuttil et al., 1977).

Le noyau est situé au niveau basal de la cellule alors que les mitochondries sont abondamment retrouvées au niveau apical de la cellule (Hansell and Moretti, 1969), fournissant ainsi de façon efficace l'énergie indispensable au battement ciliaire (Blanquart et al., 1995). Le battement ciliaire est coordonné, polarisé, dissymétrique et planaire (Sleigh, 1981). C'est la synchronisation du battement ciliaire qui permet le déplacement efficace du mucus vers le pharynx. *Ex vivo*, la fréquence de battement des cils de l'épithélium respiratoire est comprise entre 10 et 15 Hz (Zahm et al., 1990), la fréquence étant plus élevée dans les bronches proximales que dans les bronches distales (Rutland et al., 1982). La structure de l'axonème, du corps basal ainsi que du pied basal reste inchangée entre les différents épithéliums multiciliés eucaryotes. Tous partagent une structure de type motile « 9+2 », caractérisée par la présence du doublet de MT centraux (cf. partie I. 3. A). Comme nous l'avons vu, l'interaction entre les MT et les bras de dynéines permet le glissement des doublets de MT nécessaire pour le battement des cils (Wanner et al., 1996).

Les cellules multiciliées sont considérées comme différenciées de façon terminale, étant incapables de se diviser à nouveau pour proliférer (Kauffman, 1980; McDowell et al., 1983). Cette règle est susceptible d'être remise en cause avec la découverte du mécanisme de transdifférenciation des cellules multiciliées en cellules sécrétrices de mucus (Park et al., 2006a; Turner et al., 2011; Tyner et al., 2006). Les cellules multiciliées ne sont pas directement attachées à la lame basale par des hémidesmosomes, mais plutôt grâce à des desmosomes (cf. partie II. 2. J. 1)) qui les lient aux cellules adjacentes (Shebani et al., 2005). Outre leur rôle dans le transport du mucus par le battement ciliaire (cf. partie II. 2. J. 3) e), elles ont également un rôle dans les transports hydro-électrolytiques à travers la muqueuse respiratoire (Nadel, 1985), ainsi que dans la sécrétion de macromolécules (Varsano et al., 1987). De plus, les cellules multiciliées expriment sur leur membrane apicale les protéines ENaC (Barbry and Lazdunski, 1996) et CFTR (Puchelle et al., 1992), impliquées dans les transports d'ions Na^+ et Cl^- (Fang et al., 2002; Shen et al., 1995) (cf. partie II. 2. J. 2)).

2) Les cellules basales

Les cellules basales sont retrouvées dans l'ensemble des épithéliums stratifiés et pseudo-stratifiés. D'un point de vue morphologique, on les distingue par leur petite taille, leur forme triangulaire et un rapport noyau/cytoplasme très élevé. Elles sont situées dans la partie la plus basale de l'épithélium respiratoire de surface au contact de la lame basale. Elles sont plus nombreuses au niveau proximal de l'arbre respiratoire où elles représentent environ 30 % de la population épithéliale et recouvrent à 90 % la lame basale (Mercer et al., 1994; Rock et al., 2009). Elles sont de moins en moins nombreuses au niveau distal (Baldwin, 1994) où elles ne représentent que 2 à 10 % de la population dans les segments bronchiolaires inférieurs à 0,5 mm (Boers et al., 1998). Leur nombre est fortement corrélé à la hauteur de l'épithélium de surface et est proportionnel à celui des cellules cylindriques (Evans et al., 1992; Evans et al., 1990; Evans et al., 1989; Evans and Moller, 1991).

Les cellules basales sont rattachées à la lame basale par les hémi-desmosomes, et aux cellules épithéliales avoisinantes par des desmosomes, conférant ainsi cohésion et stabilité à l'épithélium respiratoire (cf. chapitre II. 2. J. 1) c) (Shebani et al., 2005). Elles se distinguent des autres cellules de l'épithélium respiratoire par l'expression de certains marqueurs intracellulaires comme les cytokératines-5, -13, -14 et -17 (Dupuit et al., 2000; Evans et al., 2001; Nakajima et al., 1998; Rock et al., 2009), des marqueurs membranaires comme le CD151 (« cluster de différenciation 151 » ou tétraspanine) et le facteur tissulaire (TF pour Tissue Factor) (Hajj et al., 2007), ou d'un marqueur nucléaire comme le facteur de transcription transformation-related protein 63 (TRP63) (Daniely et al., 2004; Dellavalle et al., 2001).

Dans la perspective d'identifier les cellules souches de l'épithélium respiratoire, des premiers travaux réalisés à partir de souris transgéniques créées sous promoteur de la cytokératine-14, ont pu montrer qu'après lésions de l'épithélium *in vivo*, les nouvelles cellules multiciliées et sécrétrices de mucus qui repeuplent la région lésée dérivait toutes deux des cellules basales (Hong et al., 2004a; Hong et al., 2004b). Ces résultats suggéraient ainsi que ces cellules basales pouvaient, outre leur rôle dans l'ancrage de l'épithélium respiratoire à la lame basale, jouer un rôle de cellules souches/progénitrices. Différents travaux ont montré par la suite que les cellules basales, triées par cytométrie de flux avec différents marqueurs basaux, étaient bien capables de redonner *in vitro* un épithélium mucocilié pleinement différencié (Hajj et al., 2007; Rock et al., 2009). Il est à présent clairement établi que ces cellules basales jouent un rôle important dans la régénération et la réparation de l'épithélium respiratoire lésé, comme le suggère aussi l'identification de signature transcriptomique associée à des récepteurs et des facteurs de croissance et de prolifération (Hackett et al., 2011).

3) Les cellules sécrétrices de mucus

Les cellules sécrétrices de mucus sont aussi appelées cellules caliciformes, en raison de leur morphologie en forme de calice, ou cellules en gobelet (goblet cell en anglais). Comme les cellules multiciliées, les cellules sécrétoires sont de forme « cylindrique ». Dans l'arbre respiratoire depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles, on les retrouve aussi bien dispersées au milieu des cellules multiciliées de l'épithélium de surface, où elles sont cinq fois moins nombreuses que les cellules multiciliées (Breeze and Wheeldon, 1977; McDowell et al., 1983; Wanner et al., 1996), qu'au sein des épithéliums glandulaires. Les cellules sécrétrices glandulaires sont 40 fois plus abondantes que les cellules sécrétrices épithéliales ou cellules caliciformes à mucus. De fait, 90% du mucus est effectivement sécrété par les glandes tubulo-acineuses de la muqueuse. Dans la trachée humaine, leur nombre est estimé à 6000-7000 cellules/mm², et diminue dans la partie distale de l'épithélium de surface (Ellefsen and Tos, 1972). En revanche, elles sont absentes des zones d'échanges gazeux au niveau alvéolaire. *In vivo*, le temps de leur renouvellement a été estimé à 45 jours (Rogers, 2003b).

En microscopie, les cellules sécrétrices de mucus sont caractérisées par un noyau et des organites cellulaires situés au niveau basal des cellules, avec un cytoplasme rempli par des granules sécrétoires peu denses aux électrons, principalement localisés dans leur pôle apical (Verdugo, 1990). Ces granules sont des grains de sécrétion de 800 nm de diamètre, occupant la majeure partie du cytoplasme (Jeffery and Li, 1997). Ils renferment un mélange de protéoglycanes neutres et acides riches en acide sialique et en sulfates. Ces protéoglycanes sont essentiellement des mucines, un des composants importants du mucus respiratoire (Verdugo, 1990). Les cellules sécrétoires différenciées expriment spécifiquement les cytokératines 7, 8 et 18 (Broers et al., 1989). Outre leur fonction principale de sécrétion des mucines, les cellules sécrétoires produisent aussi des protéines à activité anti-bactérienne telles que les IgA sécrétoires (Goodman et al., 1981), la peroxydase (Christensen et al., 1981; Christensen and Hayes, 1982), etc... Dans des conditions physiologiques normales, l'épithélium de surface comprend un petit pourcentage de cellules à mucus et une majorité de cellules multiciliées, permettant un équilibre entre quantité de mucus adéquate pour piéger les particules inhalées et évacuer par expiration. Dans certaines situations de stress ou pathologiques ou en réponse aux agressions environnementales (infections microbiennes, exposition à des agents xénobiotiques, toxiques, irritants), l'épithélium respiratoire augmente sa sécrétion de mucus, la toux permettant d'expectorer les débris trappés par le mucus. Une hyperplasie de cellules sécrétoires peut alors être observée, au détriment du nombre des cellules multiciliées (Rogers, 1994; Rogers, 2003a). Les cellules hyperplasiques expriment certaines molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Tesfaigzi et al., 2000). Des études ont montré que l'interleukine-13 (IL-13) et l'EGF (« epidermal growth factor ») était capable d'inhiber l'apoptose des cellules multiciliées et de promouvoir la transdifférenciation des cellules

multiciliées en cellules à mucus (Park et al., 2006a; Tyner et al., 2006). Par la suite, l'épithélium respiratoire se rétablit et la balance entre cellules à mucus et cellules multiciliées se normalise. Cette augmentation du nombre de cellules caliciformes dans certaines situations pathologiques est également observée dans des pathologies respiratoires inflammatoires chroniques telles que l'asthme, les dyskinésies ciliaires, la mucoviscidose ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (cf. partie II.3.A.3).

4) Les cellules intermédiaires ou parabasales

Les cellules intermédiaires ou parabasales constituent 7 % de la population totale des cellules de l'épithélium bronchique et 33% des cellules prolifératives au niveau des voies aériennes de conduction. Elles sont localisées entre les cellules basales et cylindriques (Boers et al., 1998). Tandis qu'en microscopie optique, ces cellules ne semblent partager de caractéristiques morphologiques communes ni avec les cellules multiciliées, ni avec les cellules caliciformes, sécrétrices de mucus ou neuroendocrines, (Boers et al., 1998; Breeze and Wheeldon, 1977; Breuer et al., 1990; Donnelly et al., 1982; Mercer et al., 1994), une étude en microscopie électronique à transmission a révélé en revanche des similitudes morphologiques avec les cellules basales. Fusiformes, ces cellules n'atteignent pas la surface de l'épithélium. Leur fonction demeure encore hypothétique. Elles pourraient constituer des éléments de transition en cours de différenciation en cellules multiciliées ou sécrétoires (Donnelly et al., 1982). D'après les travaux de Donnelly, elles pourraient aussi contribuer au renouvellement des cellules cylindriques en tant que cellules basales en cours de différenciation (Donnelly et al., 1982).

5) Les cellules canalaire

Ce sont les cellules des canaux glandulaires de l'épithélium trachéo-bronchique, qui sont en continuité avec les cellules de l'épithélium de surface. L'épithélium canalaire contient une grande majorité de cellules multiciliées, permettant la propulsion des sécrétions glandulaires vers le liquide de surface. C'est aussi au niveau de ces canaux glandulaires qu'une niche de cellules souches de l'épithélium trachéo-bronchique a été suggérée (Borthwick et al., 2001).

6) Les cellules séreuses

Les cellules séreuses (qui contiennent des protéines de type sérique) ont été décrites dans l'épithélium de surface de souris, de rats, de chats, de jeunes hamsters et de fœtus humains (Jeffery and Li, 1997; Pack et al., 1980). Elles ont également été décrites au niveau des petites bronches et bronchioles chez l'Homme (Rogers et al., 1993), mais ne sont exprimées que de façon transitoire lors du développement embryonnaire (Gaillard et al., 1994). Au niveau glandulaire, elles sont plus

nombreuses et ressemblent morphologiquement aux cellules séreuses de l'épithélium de surface. A l'inverse des cellules sécrétoires, leur cytoplasme contient des granules denses aux électrons de diamètre allant de 300 à 1800 nm (Meyrick and Reid, 1970). Ces granules renferment des protéines telles que le lysozyme (Hinnrasky et al., 1990), la transferrine (Bowes et al., 1981), ou l'antileucoprotéase (Franken et al., 1980). Les cellules séreuses sécrètent également des mucines neutres sulfatées (Lamb and Reid, 1970) et des substances non muqueuses telles que des lipides (Spicer et al., 1980).

7) Les cellules myoépithéliales

Présentes au pourtour des acini glandulaires formés par les cellules séreuses et muqueuses, les cellules myoépithéliales sont de forme allongée, positionnées à la base de l'épithélium glandulaire en contact avec la lame basale. Elles expriment la cytokératine 14 qui est caractéristique des cellules épithéliales basales, et l' α -actine caractéristique des fibres musculaires lisses. Elles entourent les glandes, et en se contractant, elles favorisent l'expulsion des sécrétions glandulaires depuis les tubes collecteurs vers la lumière des voies aériennes par la pression qu'elles exercent sur les glandes. Les tachykinines sécrétées par les terminaisons nerveuses, et surtout par les cellules inflammatoires au niveau glandulaire, favorise la contraction glandulaire *via* NK1, le récepteur de la substance P, qui est situé sur la membrane des cellules myoépithéliales (Springer et al., 2005), et dont l'activation stimule le cheminement des sécrétions glandulaires de mucus vers le liquide de surface. Ces médiateurs inflammatoires modulant l'hypersécrétion de mucus pourraient avoir une implication dans certaines maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme, la BPCO ou la mucoviscidose.

J. Les différentes fonctions de l'épithélium respiratoire

Les voies respiratoires sont en contact permanent avec l'environnement extérieur et exposées continuellement à des molécules toxiques, agressives, ou à des agents pathogènes. L'épithélium respiratoire constitue une barrière physique et physiologique de défense protégeant l'organisme contre les fréquentes agressions externes. Cette propriété indispensable est assurée par plusieurs mécanismes associés, et dont l'orchestration est essentielle au maintien homéostatique de l'intégrité tissulaire. Le rôle de barrière physique requiert un ensemble cellulaire cohésif mettant en jeu de nombreuses jonctions spécifiques. La clairance mucociliaire, qui vise à éliminer les particules toxiques inhalées, nécessite i) une fonction et un battement coordonnés des cils motiles, ii) une constitution physico-chimique précise du volume périliaire (électrolytes, ions, eau, protéines, mucines...), iii) une sécrétion épithéliale de molécules anti-microbiennes et de cytokines nécessaires à la mise en place

d'une fonction immune de l'épithélium et à son interaction efficace avec les cellules immunitaires environnantes.

1) *Intégrité de la barrière épithéliale*

L'épithélium respiratoire forme une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'organisme. L'intégrité de cette barrière protège l'organisme des aéro-contaminants et autres agents pathogènes. La cohésion physique de la barrière est assurée par plusieurs types de complexes jonctionnels qui vont également définir la polarité apico- basal de l'épithélium (cf. figure 17).

a. *Les jonctions serrées*

Les jonctions serrées (*zonula occludens*) sont localisées au niveau apical de la membrane basolatérale des cellules épithéliales cylindriques où elles déterminent une barrière physiologique entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme en limitant le passage de molécules dans l'espace paracellulaire (Gumbiner, 1993). Elles établissent la polarité de la cellule en déterminant le domaine basolatéral et le domaine apical de la membrane cellulaire. Les jonctions serrées sont des complexes multiprotéiques incluant les protéines ZO1 (*zonula occludens type 1*), ZO-2 et ZO-3 (Gumbiner, 1993; Jesaitis and Goodenough, 1994). Leur association à plusieurs familles de protéines membranaires (occludines, claudines, JAM : Junctional Adhesion Molecule) établit une jonction serrée qui ceint l'apex de la cellule épithéliale. Si la jonction serrée constitue une barrière, elle reste cependant perméable à certaines petites molécules (transport paracellulaire).

b. *Les jonctions intermédiaires*

Pour renforcer la cohésion et l'adhérence intercellulaire de l'épithélium respiratoire, des jonctions intermédiaires ou jonctions adhérentes (*zonula adherens*) forment une ceinture jonctionnelle autour des cellules épithéliales en dessous des jonctions serrées. Elles sont constituées par les E-cadherines, protéines transmembranaires localisées au niveau de la membrane basolatérale, qui permettent des interactions entre chaque cellule adjacente. Chaque jonction intermédiaire est reliée au cytosquelette d'actine de la cellule par l'intermédiaire des caténines (α , β et p120-caténine), de l' α -actinine et de la vinculine (Shapiro and Weis, 2009). En plus de sa fonction structurale, la β -caténine est au cœur de la régulation de la voie canonique Wnt. En effet la β -caténine est un effecteur clé de la transduction du signal vers le noyau, qui contrôle ainsi l'expression de certains gènes cibles impliqués dans la différenciation cellulaire dans de nombreux tissus (Valenta et al., 2012). Le rôle essentiel de cette ceinture est de renforcer l'intégrité de l'épithélium lors des modifications de formes générées par les changements conformationnels des filaments d'actine (Perez-Moreno et al., 2003).

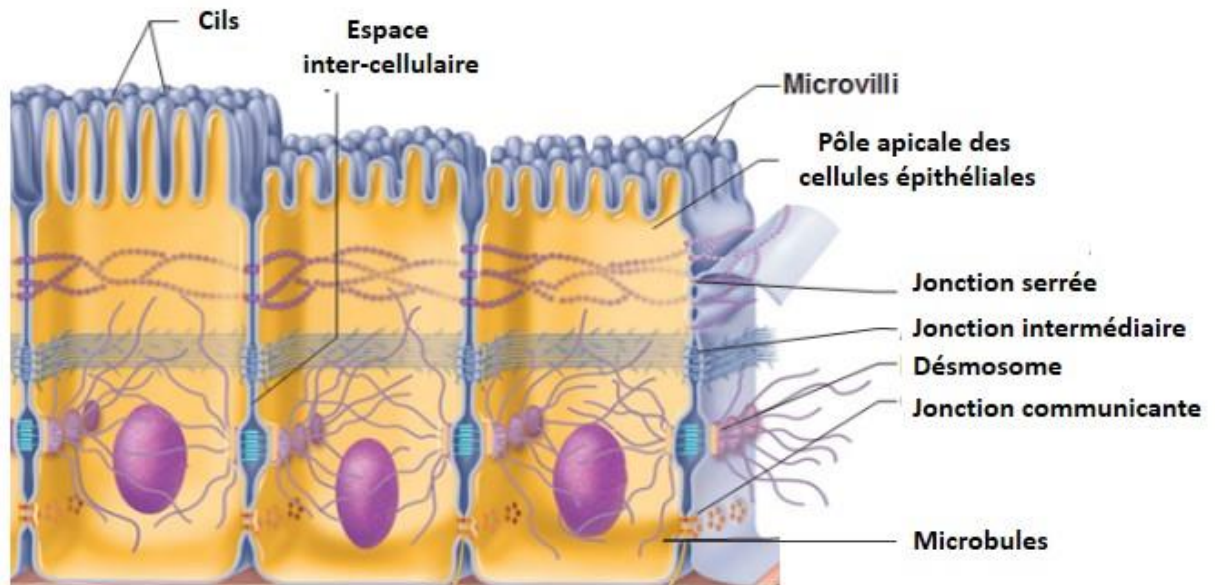


Figure 17: Les jonctions des cellules cylindriques

Une des fonctions de l'épithélium respiratoire est de former une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'organisme. Elle est assurée par différents complexes jonctionnels au niveau des cellules cylindriques par la présence de jonctions serrées, de jonctions intermédiaires, de désmosomes et de jonction communicantes.

c. Les desmosomes

Les desmosomes (*macula adherens*) ont une distribution ponctiforme et sont distribués sur l'ensemble de la surface basolatérale en dessous de la ceinture des jonctions adhérentes. Ces jonctions d'ancrage sont caractérisées par la présence de plaques protéiques denses (les desmoplakines de type 1, 2, 3 et 4) dans lesquelles s'insèrent les filaments intermédiaires de cytokératines des cellules adjacentes qui assurent ainsi cohésion et interaction intercellulaire (Baum and Georgiou, 2011).

d. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (ou gap junction) assurent une communication intercellulaire en formant des pores de large diamètre constitués principalement d'hexamères de molécules de connexines (Falk, 2000). Elles permettent la diffusion passive de molécules de petite taille (<1 kDa : AMP cyclique, nucléotides, Ca^{2+} , l'inositol-1,4,5-tris-phosphate...) entre deux cellules adjacentes. Ces jonctions communicantes ont été impliquées dans de nombreux processus cellulaires (prolifération, différenciation, réparation, morphologie cellulaire) (Ahmad et al., 2001; Crespín et al., 2011; Willecke et al., 2002).

e. Les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont des complexes multiprotéiques de 0,1 à 0,5 μm de diamètre, localisés spécifiquement au pôle basal des cellules épithéliales basales (Schwarz et al., 1990; Shebani et al., 2005). Elles sont situées contre la lame basale sous-jacente où elles assurent une fonction de stabilité cellulaire en ancrant les cellules via des hétérodimères d'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ (Lee et al., 1992; Stepp et al., 1990). Ces jonctions agissent comme un transducteur de signal (Borradori and Sonnenberg, 1996). Elles sont aussi liées aux filaments de cytokératine permettant d'établir une connexion entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire en particulier le collagène de type VII et la laminine 5 (Garrod, 1993). Ce sont des structures dynamiques qui interviennent au cours des processus de remodelage tissulaire par un assemblage et désassemblage de l'édifice moléculaire permettant ainsi de maintenir l'intégrité du tissu épithélial (Tsuruta et al., 2003).

2) Les transports hydro-électrolytiques

Une fonction essentielle des cellules épithéliales concerne le transport d'eau et d'électrolytes (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} ,...) qui permet de réguler le volume et la composition du liquide de surface des voies aériennes. Ces flux ioniques sont réalisés par l'intermédiaire de canaux ioniques et de transporteurs, localisés de manière asymétrique à la membrane apicale et basolatérale permettant la mise en place de transports vectoriels de fluide (Ussing and Zerahn, 1951). Un couplage complexe entre les transports de cations (principalement Na^+) et les transports d'anions (principalement Cl^-), associés à

Les transports ioniques transmembranaires peuvent se faire de manière passive, ou sinon active, lorsqu'il y a consommation d'ATP. Le cœur fonctionnel du transport actif est constitué par la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dont l'activité est nécessaire pour le maintien des gradients électro-chimiques de Na^+ et de K^+ au niveau de la membrane plasmique. La première description physiologique d'une absorption active de Na^+ a été réalisée en 1958 par Kœfoed-Johnsen et Ussing (Koefoed-Johnsen and Ussing, 1958). Selon ce modèle, le couplage entre l'électrodifusion passive de sodium par des canaux ou des transporteurs de sodium présents à la surface de la membrane apicale (e.g. ENaC pour canal sodium épithélial) (Barbry and Lazdunski, 1996) et la sortie active du sodium intracellulaire par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ située sur la membrane basolatérale génère un transport vectoriel transcellulaire de sodium. Un passage simultané d'un anion, (ion chlorure par exemple) ou d'un cation (le plus souvent ion potassique) permet de respecter l'électro-neutralité globale dans les différents compartiments, et s'accompagne éventuellement d'un transport de liquide.

La réabsorption vectorielle de NaCl et d'eau peut mobiliser plusieurs systèmes de transports différents, en fonction du tissu considéré : NKCC2 (apical), cotransporteur Na⁺/Cl⁻ (NCC), échangeur Na⁺/H⁺ (NHE) ou canal Na⁺ épithélial (ENaC). La présence d'une perméabilité sodique importante induit une dépolarisation de la membrane apicale et favorise l'absorption apicale de Cl⁻ par des canaux Cl⁻ localisés dans la membrane apicale (e.g. CFTR) (Fang et al., 2002). Le Na⁺ est ensuite relargué à l'extérieur par la pompe Na⁺/K⁺-ATPase et le Cl⁻ par des canaux Cl⁻ basolatéraux (Kunzelmann and Mall, 2002; Kunzelmann and Schreiber, 1999). A l'inverse, le blocage de cette même conductance sodique (avec de l'amiloride par exemple (Barbry and Lazdunski, 1996)) va hyper-polariser la membrane

apicale, et inverser alors le sens de transport des ions Cl^- , qui seront alors secrétés. Les ions Cl^- sont transportés par différents systèmes dont le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) dont la dysfonction est responsable de la mucoviscidose (cf. partie II. 3. A. 2)), des échangeurs d'anion (AE) $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, divers familles de canaux Cl^- dont la famille CLC qui peuvent être activés par différents messagers intracellulaires tels que le Ca^{2+} , l'AMPc, le GMPc, diverses protéines kinases dont l'activation est induite par de nombreux médiateurs ou signaux extracellulaires (Jentsch et al., 2002; Kunzelmann and Mall, 2002; Kunzelmann and Schreiber, 1999; Nilius and Droogmans, 2003). Le mécanisme de sécrétion active du Cl^- nécessite une entrée de Cl^- à travers la face basolatérale *via* un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC1), dont l'activité couplée à une pompe Na^+/K^+ -ATPase fournit la force électromotrice nécessaire à ce transport (Jorgensen et al., 2003). Ce transport baso-latéral est couplé à une sortie apicale de Cl^- qui a lieu par électrodiffusion à travers des canaux Cl^- . Le mécanisme complet implique également l'ouverture de canaux K^+ (SK4, KvLQT1). Le gradient ionique généré par la pompe Na^+/K^+ -ATPase au pôle basolatéral permet de maintenir le gradient d'ions K^+ , différents canaux potassiques (dépendants du voltage et/ou du calcium) contribuant au maintien du potentiel de membrane. Une trentaine de canaux potassiques distincts au sein des voies respiratoires, situés de façon spécifique sur les pôles apicaux ou basolatéraux de cellules spécifiques, contribue indirectement à l'homéostasie des ions Na^+ et Cl^- , ainsi qu'au contrôle des volumes du liquide de surface ainsi que de sa composition. Il a enfin été montré que l'activité de certains canaux modulerait la prolifération et la migration de certains types cellulaires, ce qui pourrait avoir un impact sur la réparation du tissu respiratoire après lésion (Trinh et al., 2012; Trinh et al., 2007).

L'ensemble de ces différents transports d'ions est sous le contrôle de médiateurs ou de signaux extracellulaires (e.g. noradrénaline, acétylcholine, nucléotides extracellulaires ATP, UTP, stress mécaniques...) (Marcet and Boeynaems, 2006; Quinton, 1999), qui vont ainsi pouvoir contrôler la composition du volume périciliaire, la fluidité du mucus, le battement ciliaire, et au final la clairance mucociliaire et l'activité antimicrobienne de certaines substances sécrétées par l'épithélium (Paisley et al., 2010).

3) *La clairance mucociliaire*

Les voies respiratoire constitue une surface de contact avec l'environnement de plus de 100 m^2 qui représente de ce fait une porte d'entrée importante pour les agents pathogènes. La séparation en une zone de conduction (trachée et bronches qui représente de l'ordre de 25 à 30% de la surface totale d'échange) et une zone d'échange (les alvéoles qui représentent plus de 70% de la surface totale d'échange) permet une certaine optimisation des fonctions de l'organe, en réduisant notamment la présence des débris et des pathogènes dans la région la plus distale. Pour protéger l'organisme, l'épithélium respiratoire des voies aériennes supérieures est tapissé d'un film liquide visqueux

permettant l'élimination d'une partie importante des particules inhalées. Les cils motiles présents au pôle apical des cellules multiciliées, permettent par leur battement coordonné, l'expulsion des particules inhalées piégées dans ce film mucoïde par un mécanisme dénommé « clairance mucociliaire ». Il constitue ainsi une première ligne de défense contre les pathogènes. Cependant, dans certaines pathologies respiratoires comme l'asthme, la mucoviscidose ou les BPCO, on assiste à un remodelage de l'épithélium respiratoire associée à la perte des cellules multiciliées et à une hyperprolifération des cellules sécrétrices de mucus. La conséquence immédiate de ces modifications est l'altération de cette clairance mucociliaire.

a. Le mucus

Le mucus est composé à 95 % d'eau et 5 % d'ions et de protéines glycosylées, il forme un film tapissant l'épithélium respiratoire qui maintient son hydratation. Les protéines retrouvées majoritairement au sein du mucus sont les mucines. Les mucines sont des protéines filamenteuses de très hauts poids moléculaire fortement glycosylées par de nombreuses chaînes O-glycaniques qui représentent 50 à 80 % de la masse totale (cf. figure 18).

On distingue les mucines sécrétées et les mucines membranaires. Les mucines majoritaires sécrétées au niveau des voies aériennes, sont MUC2, MUC5AC, MUC5B. Leurs domaines riches en cystéines permettent l'oligomérisation et la polymérisation. Cette structure multimérique procure la configuration tridimensionnelle d'un gel (Van Klinken et al., 2000; van Klinken et al., 1998). Les mucines, MUC5AC et MUC5B, sont les molécules prédominantes dans la formation du gel de mucus (Hovenberg et al., 1996; Sheehan et al., 1999). La mucine MUC5AC est produite par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface bronchique tandis que MUC5B est sécrétée majoritairement par les glandes de la sous-muqueuse (Hovenberg et al., 1996; Wickstrom et al., 1998). Les mucines membranaires, MUC1, MUC3, MUC4 et MUC13, possèdent un domaine glycoprotéique transmembranaire (Moniaux et al., 1999; Williams et al., 1999; Williams et al., 2001). Elles sont retrouvées également dans le mucus mais elles ne participent pas à la formation du réseau tridimensionnel. Les mucines confèrent au mucus des propriétés rhéologiques bien précises afin de lui établir des propriétés de viscoélasticité et de filance (capacité à former des fils) compatibles avec le transport mucociliaire (Puchelle et al., 1983).

Les mucines sont responsables de la viscosité de la couche de mucus et leur sécrétion est régulée en fonction du contexte infectieux de l'épithélium : dans le cas d'infection à certains pathogènes (Barbier et al., 2012; Klinger et al., 1984) ou en réponse à certaines cytokines pro-inflammatoires (Longphre et al., 1999; Shim et al., 2001), on observe une augmentation de la production et de la sécrétion de mucines. Un modèle de clairance mucociliaire détaillé plus loin met

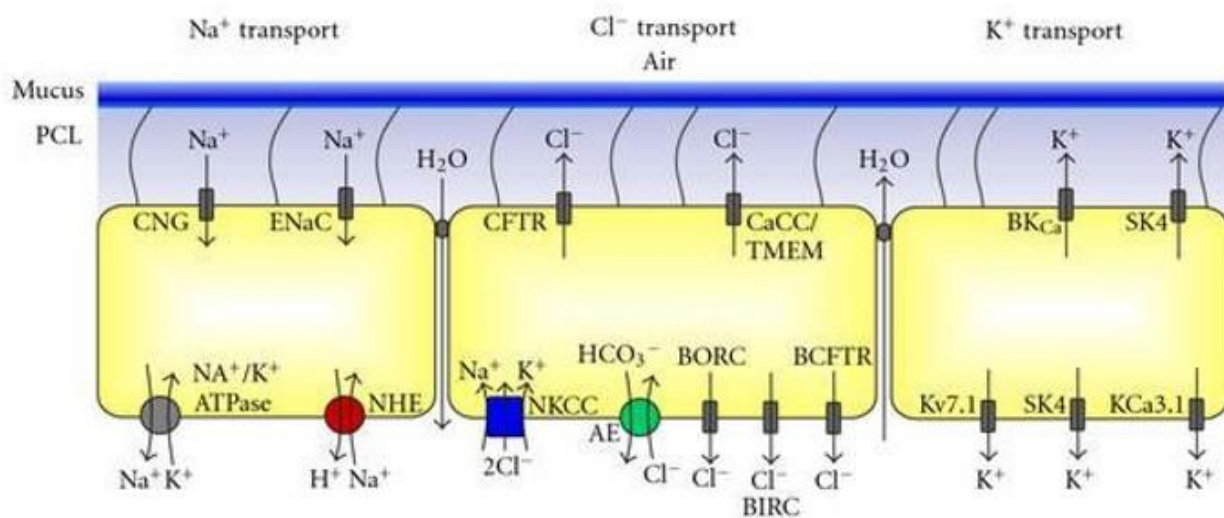


Figure 18: Les transports hydro-électrolytes. (d'après Hollenhorst et al., 2011)

Représentation schématique des transports d'électrolytes au niveau de l'épithélium respiratoire entre les cellules épithéliales (jaune) et le liquide périliciliaire (bleu clair). La composition du liquide périliciliaire est régulée par le transfert d'ions et notamment par la réabsorption de sodium (Na⁺) et la sécrétion de chlore (Cl⁻). Ces transports d'ions entraînent le passage d'eau qui suit le gradient osmotique faisant ainsi varier la composition de liquide périliciliaire. Les différents types de transport bien que retrouvés en générale dans la même cellule sont ici séparés: gauche le transport de Na⁺, au milieu celui de chlore et à droite celui de potassium (K⁺).

en avant la capacité des mucines à former un maillage dense permettant de contenir les pathogènes et d'empêcher le contact direct avec les cellules épithéliales (Button et al., 2012).

b. Le liquide de surface (ASL)

Le liquide de surface est composé de deux phases distinctes : la phase « sol », ou liquide périciliaire, qui est l'espace dans lequel les cils motiles battent. La phase « gel » correspond à la couche de mucus mobile dans laquelle sont emprisonnées les particules inhalées. La phase « gel » est évacuée lors de la clairance mucociliaire par le battement coordonné des cils motiles.

Le modèle conventionnel postule que les cils baignent dans un liquide très peu dense en mucines de manière à permettre le battement ciliaire. La couche de mucus formerait ainsi une couche protectrice mobile très dense en mucines, située au-dessus des cils motiles.

Récemment, Button et collègues ont proposé un modèle type « gel sur brosse » dans lequel le battement coordonné des cils est expliqué en partie par un maillage dense de mucines reliant les cils motiles. Le maillage composant la couche périciliaire permettrait de filtrer certaines particules (Button et al., 2012). Ce modèle postule que la présence de deux couches distinctes est maintenue par la création d'une pression osmotique dépendant de la composition en mucines qui est différente entre les deux couches. Dans des conditions non-pathologiques, un équilibre « visco-chimique » permet le maintien des deux couches. En revanche, dans des cas d'hypersécrétion de mucus, la pression osmotique induit une diminution de la hauteur du liquide périciliaire, qui a pour conséquence directe des défauts de battements ciliaires et une altération de la clairance mucociliaire.

c. Phase Gel

La phase gel, composée à 97% par de l'eau, se structure en un réseau dense de mucines. La présence des mucines (principalement Muc5AC et Muc5B) confère à cette couche certaines caractéristiques physiques : le mucus est élastique et visqueux. Muc5AC et Muc5B forment des polymères dits homotypiques : un seul type de mucines est retrouvé dans chaque polymère. L'enchevêtrement de ces polymères de mucines s'effectuent par la création de liaisons non covalentes calcium-dépendantes et forment ainsi un maillage dense, avec une porosité d'environ 500 nm. Cela confère une viscosité et une élasticité qui dépendent de la concentration en mucines (Thornton et al., 2008; Thornton and Sheehan, 2004) (cf. figure 19). Cependant, la largeur du maillage confère une perméabilité à certains petits virus à capsides hydrophiles qui sont ainsi capables d'infecter les voies respiratoires.

En revanche dans certaines pathologies respiratoires, l'hypersécrétion de mucus consécutive à une inflammation peut aboutir à une augmentation de la concentration de mucus qui peut

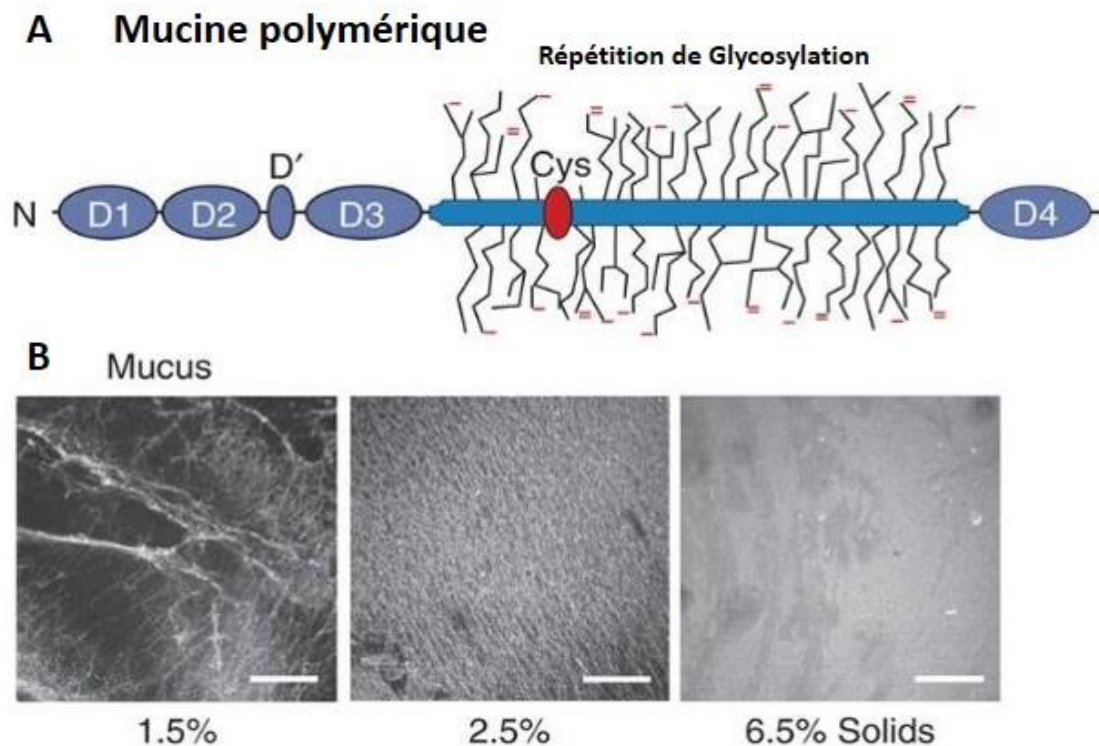


Figure 19: Modifications post-traductionnelles des mucines et impact de la concentration en mucines sur le gel de mucus (d'après Kreda et al., 2012)

- A. Représentation des domaines des mucines polymériques représentatif de MUC2, MUC5AC et MUC5B. La partie central est composée de nombreux domaines riches en Cystéine et des répétitions de domaines de glycosylation.
- B. Observation du gel de mucus de cellules bronchiques humaines marqué en fluorescence avec de l'agglutinine fluorescente. Le maillage observé varie en fonction de la concentration en mucus (indiquée en dessous de chaque image). Un contrôle correspond à l'image « 1,5% ». Des cellules bronchiques non pathologiques correspondent à l'image du centre (2,5%) alors que l'image de droite (6,5%) est représentative du gel de mucus retrouvé chez les patients CF, avec un maillage beaucoup plus dense.

représenter jusqu'à 15% de la phase « gel » et affecter alors la clairance mucociliaire (Thornton and Sheehan, 2004).

d. Liquide périciliaire

Le liquide périciliaire (LPC) était encore défini il y a peu comme une couche aqueuse dénuée de mucus, de manière à permettre le battement ciliaire. L'épaisseur de cette couche apparaissait comme étroitement dépendante de sa composition ionique (Tarran, 2004) (cf. partie II. 2. J. 2)) : un LPC trop mince induit l'écrasement des cils par la couche de mucus, empêchant ainsi le battement ciliaire. A l'inverse un LPC trop épais empêche l'action des cils sur la couche de mucus (Sleigh, 1981). De nombreuses protéines et peptides aux propriétés antimicrobiennes (défensines, chimiokines) et immunologiques (interleukines, cytokines, chimiokines) sont retrouvés dans le LPC et contribuent à assurer la défense de l'épithélium respiratoire (Bals et al., 1998; Bowes et al., 1981; Cole et al., 2002; Dajani et al., 2005).

Récemment, Kesimer et collègues ont combiné des approches de protéomique et de microscopie pour démontrer la localisation exclusive de MUC5AC et de MUC5B au sein de la couche de mucus et son absence du LPC. (Kesimer et al., 2013). Ces études montrent que MUC1, MUC2, MUC16 et MUC20, des mucines associées aux membranes, sont retrouvées dans le LPC. Des expériences de microscopie électronique révèlent des localisations préférentielles sur certains types cellulaires : les auteurs mentionnent notamment la présence de MUC4 et MUC20 sur les cils motiles (Kesimer et al., 2013).

e. Battement ciliaire

Le battement de cils est la base du processus de clairance mucociliaire qui est indispensable à la défense de l'organisme (Knowles and Boucher, 2002). De nombreuses pathologies respiratoires sont associées à un défaut de clairance mucociliaire. Une meilleure caractérisation des différents événements moléculaires contrôlant le battement ciliaire est indispensable pour comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans certaines pathologies respiratoires comme la mucoviscidose, les BPCO, l'asthme et les dyskinésies ciliaires.

Le battement ciliaire est un système synchronisé entre les centaines de cils présents à la surface d'une même cellule multiciliée, qui est également coordonné entre les cellules multiciliées adjacentes. Des expériences indiquent une vitesse de propulsion de liquide par les cils motiles de 0,5 mm par seconde (King et al., 1974) pour une fréquence de battement ciliaire comprise entre 7 Hz et 20 Hz (Sanderson and Dirksen, 1985). Un mouvement plan asymétrique se met en place, caractérisé par 2 phases distinctes : une première phase rapide dite effectrice et une deuxième phase lente dite de rétablissement (cf. figure 20).

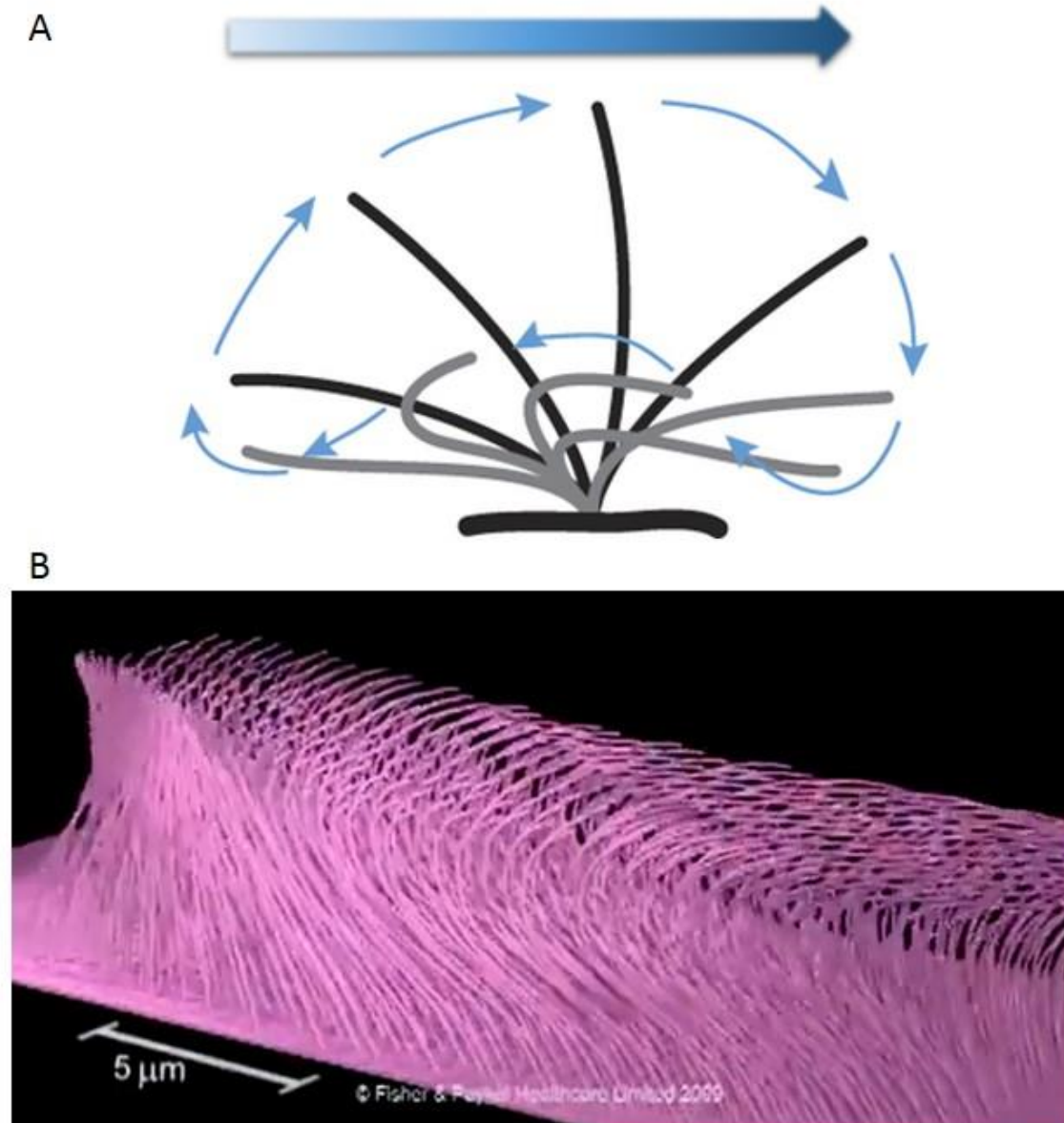


Figure 20: Mouvement ciliaire lors de la clairance mucociliaire

- A. Représentation des différentes positions des cils au cours du mouvement ciliaire. La phase de rétablissement (cil en gris) permet après une propulsion le retour du cil en position initiale (extrémité gauche de l'image). La phase de propulsion dite effectrice (cil en noir) permet un contact efficace avec le liquide à propulser. L'ensemble du mouvement permet la propulsion directionnelle des fluides indiquée ici par la flèche bleue.
- B. Représentation 3D du battement ciliaire retrouvé dans l'épithélium respiratoire. Dans les cellules multiciliées un léger décalage est créé entre les mouvements ciliaires de chaque cil motile pour éviter un encombrement trop important. Sur un ensemble de cellules multiciliées comme représentées ici, on a alors à un temps donné un mouvement de la clairance mucociliaire par vague.

Lors de la phase effectrice, le cil est dans un plan perpendiculaire par rapport à l'épithélium (Sanderson and Sleight, 1981). A ce moment, l'extrémité de l'axonème est en contact direct avec la couche de mucus et permet sa propulsion.

La deuxième phase de rétablissement, correspond au retour à la position initiale sans affecter la propulsion de la couche de mucus. Lors de cette phase, l'axonème du cil se courbe, puis revient à sa position initiale dans un plan incliné par rapport à l'épithélium (Sanderson and Sleight, 1981).

Chaque cellule multiciliée étant composée de plusieurs centaines de cils motiles, un décalage entre les battements des cils d'une même cellule permet de générer une vague à la surface de l'épithélium respiratoire pour ne pas entraver le battement des cils motiles voisins (cf. figure 20).

Quelques études mettent en évidence certains acteurs indispensables pour le battement ciliaire qui n'affectent pas la structure du cil : ces études mettent en avant l'importance des mesures sur plusieurs paramètres ciliaires pour évaluer l'impact sur la clairance mucociliaire (Horani et al., 2013; Moore et al., 2013). Par exemple, Horani et collègues montrent que la mutation de *CCDC65*, un membre du complexe régulateur nexine-dynéine, induit un battement ciliaire anormal affectant la direction et donc l'efficacité de la clairance mucociliaire (Horani et al., 2013). Par ailleurs, le battement ciliaire est contrôlé par divers signaux ou médiateurs extracellulaires (e.g. nucléotides, ATP, UTP...) qui agissent via la voie de signalisation calcique (Morse et al., 2001; Murakami and Eckert, 1972).

f. [Modèle « Gel-on-Brush »](#)

Le modèle conventionnel postule que la couche de mucus est « suspendue » au-dessus du LPC grâce au battement ciliaire. En utilisant des billes fluorescentes de différents diamètres, Button et collaborateurs ont réussi à discriminer le gel de mucus du LPC. De manière opposée à ce que le modèle conventionnelle postule, l'arrêt du battement ciliaire n'induit pas un mélange des deux couches, indiquant la présence dans le LPC d'une couche solide que Button et collègues interprètent par la présence d'un réseau dense de structures macromoléculaires rattaché à la membrane épithéliale comme suggéré par la présence de certaines mucines dans le LPC (Kesimer et al., 2013; Kesimer and Sheehan, 2012). Ils expliquent ainsi que le LPC soit composé de mucines rattachées aux membranes des cellules épithéliales excluant les mucines « libres » et formant ainsi deux couches distinctes. Les mucines membranaires apparaîtraient ainsi comme les poils d'une brosse dont le manche correspondrait à un cil (cf. figure 21).

Une notion est introduite par les mêmes auteurs, qui postulent que ce maillage dense tendrait à coordonner des cils motiles au sein même de l'épithélium respiratoire. L'utilisation de billes fluorescentes de diamètres différents indique que le maillage devient de plus en plus dense à proximité des cellules épithéliales, et observent une exclusion des billes au-delà de 40 nm de diamètre, taille excluant *de facto* de nombreux pathogènes (bactéries, champignons et certains virus) qui seront ainsi

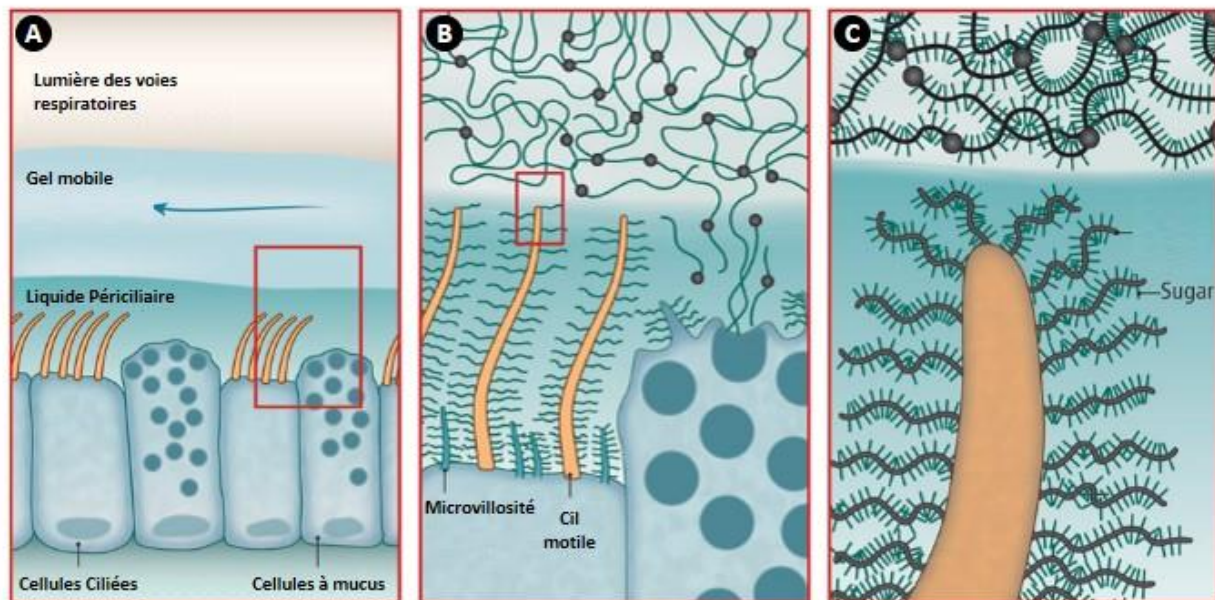


Figure 21: Nouveau modèle de gel sur brosse (gel-on-brush)(d'après Dickey, 2012)

A. La couche de gel mobile se déplace au-dessus d'une couche périciliaire immobile. Les cellules à mucus synthétisent des mucines polymériques qui constituent la couche de gel mobile et les cellules multiciliées la propulse.

B. Les cellules sécrétrices de mucus sécrètent des mucines polymériques qui vont directement dans la phase de gel mobile. Cependant, on retrouve aussi de grosses quantités de mucines associées aux membranes qui sont retrouvées dans le liquide périciliaire.

C. Les mucines associées aux membranes sont constituées d'une chaîne riche en sucres. Cet « enrobage » permet une répulsion l'une vis-à-vis de l'autre. On a ainsi la formation d'une couche organisée très dense et très saturée. Au contraire les mucines polymériques non attachées à la membrane forment une couche avec une organisation aléatoire des mucines entre elle.

retenus dans le gel de mucus mobile et donc éliminés par la clairance mucociliaire. En cas de déshydratation du mucus, observée dans de nombreuses pathologies respiratoires (e.g. mucoviscidose), c'est moins l'augmentation de la viscosité du mucus qui empêcherait le battement ciliaire que l'écrasement de l'espace périciliaire. La séparation des deux couches induirait des échanges osmotiques entre les deux couches lors de déshydratation, et la rétractation du LPC induirait ainsi un « écrasement » des cils motiles empêchant leur mouvement ciliaire et affectant la clairance mucociliaire (Button et al., 2012).

4) *Défense immunitaire de l'épithélium respiratoire*

L'air inhalé est susceptible de contenir une multitude d'agents pathogènes, d'aéro-contaminants et d'autres particules polluantes. Confrontés à ces risques, l'épithélium respiratoire dispose d'un arsenal de molécules de défenses sécrétées dans le mucus et possédant des activités antibactériennes, antivirales et antifongiques.

- Le lysozyme est une protéine basique enzymatique et antimicrobienne, sécrétée en très grande quantité (0,1 à 1 mg/mL dans les sécrétions respiratoires), par les cellules glandulaires et les cellules caliciformes de l'épithélium de surface ainsi que par les macrophages alvéolaires, et les neutrophiles (Konstan et al., 1982).

- La lactoferrine, une glycoprotéine de la famille des transferrines, est une glycoprotéine enzymatique de 80 kDa fixant des ions ferriques (Metz-Boutigue et al., 1984). Elle est retrouvée dans plusieurs sécrétions telles que les larmes ou la salive (Levay and Viljoen, 1995; Lonnerdal and Iyer, 1995). Elle est présente dans les vésicules de sécrétions secondaires des neutrophiles et dans les granules de sécrétion des cellules glandulaires séreuses (Finkbeiner et al., 2010). Elle a une activité bactériostatique et bactéricide mais possède également des propriétés anti-inflammatoires.

- Les défensines : ce sont de petits peptides cationiques dotée d'une activité antimicrobienne touchant bactéries, parasites, moisissures et virus (Martin et al., 1995). Les défensines respiratoires sont principalement synthétisées et excrétées par les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires. Il existe 2 types de défensines : les α -défensines et les β -défensines. Les α -défensines, également appelées HNP (Human Neutrophil Peptides) sont retrouvées dans les grains azurophiles des neutrophiles (Harwig et al., 1994). Elles sont impliquées dans les phénomènes mitogéniques et chimiotactiques (Chertov et al., 1996; Murphy et al., 1993). Elles contribuent à la réparation de l'épithélium respiratoire en activant la prolifération cellulaire (Aarbiou et al., 2002). Les β -défensines, ou HBD (Human Beta Defensin), sont sécrétées par les cellules de l'épithélium et des glandes des voies aériennes (Singh et al., 1998) en réponse à une stimulation par le LPS et les cytokines telles que le TNF- α et l'interleukine-1 β . Elles sont actives contre les bactéries GRAM positives et négatives (Ganz, 2003;

Oppenheim et al., 2003). Leur activité antimicrobienne est étroitement liée au niveau de la concentration en ions Na⁺ et Cl⁻ du milieu extracellulaire (Pezzulo et al., 2012).

- Le SLPI (ou Secretory Leukocyte Protein Inhibitor) est une protéine sécrétée de 11.7 kDa exprimée par les macrophages, les neutrophiles et les cellules séreuses de l'épithélium respiratoire (Melrose et al., 1992). SLPI est abondamment retrouvé au niveau pulmonaire. Le domaine C terminal possède une activité inhibitrice de l'élastase neutrophilaire ainsi que de la cathepsine G, jouant un rôle important dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Il possède une activité antibactérienne et antivirale (Gauthier et al., 1982).

- La cathélicidine (LL-37) est une protéine antimicrobienne appartenant à la famille des cathélicidines. Elle est retrouvée dans les granules spécifiques des neutrophiles, les lymphocytes et les cellules épithéliales respiratoires (Agerberth et al., 2000). Elle est présente sous une forme inactive et le précurseur (hCAP-18) a besoin d'être clivé par la protéinase 3. Elle a une action chémo-attractante vis-à-vis des cellules immunitaires au foyer d'inflammation ou d'infection. Cependant, la LL-37 a une activité réduite dans le cas de la mucoviscidose où son action bactéricide est inhibée.

- Lactopéroxydase : Les cellules épithéliales des voies respiratoires peuvent sécréter la lactopéroxydase intervenant lors des infections des voies aériennes (Christensen et al., 1981). L'inhibition de la lactopéroxydase entraîne une diminution de la clairance bactérienne dans les voies respiratoires (Gerson et al., 2000). La lactopéroxydase a une fonction antivirale (Pourtois et al., 1990; Tenovuo et al., 1995), anti-fongique (Lenander-Lumikari et al., 1992; Popper and Knorr, 1997) et possède un spectre d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Haemophilus influenzae* (Wijkstrom-Frei et al., 2003).

- Cytokines/Chimiokines : L'épithélium respiratoire est une barrière physique complexe qui joue aussi un rôle intrinsèque dans l'immunité innée et adaptative par l'intermédiaire de la production de nombreuses cytokines et chimiokines lui permettant d'interagir étroitement avec les cellules immunitaires environnantes (Giovannini-Chami et al., 2012; Marcet et al., 2007; Stick and Holt, 2003). Les cellules épithéliales, dans les voies respiratoires comme ailleurs, sont en effet une source de médiateurs inflammatoires comme les peptides antimicrobiens mais aussi de nombreuses cytokines (Bals and Hiemstra, 2004). En réponse à un stress ou à un signal extracellulaire donné, les cellules épithéliales peuvent sécréter diverses cytokines ou chimiokines telles que la chimiokine CCL20 (Marcet et al., 2007; Starner et al., 2003; Stick and Holt, 2003) également appelée macrophage protéine inflammatoire-3a (MIP-3a), Exodus-1 ou LARC (Schutyser et al., 2003). Dans les voies respiratoires, CCL20 a une double action: elle attire les cellules immunitaires dont les cellules dendritiques, mais possède aussi une activité antimicrobienne comme les défensines (Reibman et al.,

2003; Starner et al., 2003). Il existe une interaction étroite entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques sous-jacentes, notamment via la sécrétion de nombreux facteurs par les deux types cellulaires (Schmidt et al., 2011; Upham and Stick, 2006). Les cellules dendritiques sont capables de s'insérer entre les jonctions serrées des cellules épithéliales adjacentes et capter les bactéries directement à partir de la lumière et activer ainsi une réaction immune. De plus certains facteurs épithéliaux (CCL20, TSLP) modulent la fonction des cellules dendritiques (Rimoldi et al., 2005).

Les mécanismes régulant ces réactions immunes jouent un rôle important dans des pathologies respiratoires comme l'asthme ou la mucoviscidose qui sont associées à une infection des voies respiratoires et/ou une réponse inflammatoire exagérée, caractérisée par l'afflux de polynucléaires (neutrophiles ou éosinophiles, en fonction de la pathologie) et des concentrations élevées de cytokines (e.g. IL-8, interférons, IL4, IL13, ou IL-5) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (Balough et al., 1995; Giovannini-Chami et al., 2012). Les nucléotides extracellulaires apparaissent aussi comme des régulateurs importants de la réponse immune au sein de l'épithélium respiratoire (Marcet and Boeynaems, 2006; Marcet et al., 2007).

3. Défauts ciliaires & pathologies respiratoires (Ciliopathies)

A. Ciliopathies non motiles

Parmi les nombreuses ciliopathies d'origine génétique qui ont été identifiées au cours des dernières années, la plupart des mutations décrites affectent le cil primaire en entraînant l'apparition d'autres symptômes cliniques. Dans ce paragraphe, je détaillerai très brièvement ces pathologies car elles ne sont pas forcément reliées directement à des défauts des cils motiles des voies respiratoires.

Le cil primaire n'est pas motile mais joue un rôle primordial dans la transduction de signaux (Berbari et al., 2009), notamment au cours du développement embryonnaire. Ainsi, des mutations de protéines impliquées dans l'assemblage de l'axonème, comme par exemple KIF3A et KIF3B qui sont des dynéines de la machinerie du IFT, entraînent des défauts développementaux précoces, y compris des défauts de symétrie droite/gauche (Hirokawa et al., 2006).

Les défauts de ciliogenèse observés dans les syndromes Bardet-Biedl ou BBS affectent de nombreux organes. Différentes présentations cliniques sont observées en fonction des patients: obésité, rétinite pigmentaire, polydactylie, atteintes rénales, perte de fonction des gonades (hypogonadisme). On regroupe sous ce terme les patients présentant certains de ces symptômes, cependant d'autres manifestations cliniques peuvent apparaître en fonction de la mutation (cf. pour revue (Tobin and Beales, 2009)). Ces mutations affectent les protéines BBS qui sont des protéines localisées soit au niveau du corps basal soit au niveau des cils. A l'heure actuelle une quinzaine de protéines sont à l'origine de ces pathologies. Par ailleurs, des mutations de protéines du cil primaire

spécifiquement exprimées dans certains tissus vont causer des défauts restreints aux tissus touchés : par exemple la mutation des gènes codant pour RPRG (retinitis pigmentosa GTPase regulator) ou RPGRIP1 (RPGR-interacting protein 1) n'affecte que la rétine, où elle provoque une rétinite pigmentaire (Ferreira, 2005).

Certaines pathologies respiratoires sont associées à une clairance mucociliaire défectueuse et à des défauts de cils motiles qui peuvent être directs ou être la conséquence d'autres désordres pathologiques :

- Défaut direct du Cil : c'est le cas des dyskinésies primaires. Des mutations sur des gènes codant pour des acteurs importants pour la motilité des cils peuvent affecter la clairance mucociliaire (pour revue voir (Waters and Beales, 2011)).
- Hypersécrétion de mucus : plusieurs facteurs peuvent influencer la variation de l'hydratation du mucus, le changement dans ses composants du mucus ou de leur proportion. Ces différentes situations mènent à une accumulation du mucus empêchant la clairance mucociliaire et facilitant le développement d'infections ou d'inflammations de l'épithélium respiratoire.
- Remodelage défectueux de l'épithélium de surface : dans certaines pathologies respiratoires (mucoviscidose, BPCO, asthme sévère), l'épithélium subit des modifications importantes avec notamment une disparition progressive des cellules multiciliées au profit d'une hyperplasie sécrétoire caractérisée par une augmentation durable du nombre de cellules à mucus (Cohn, 2006). Cela aboutit à une augmentation de la quantité de mucus, qui altère la clairance mucociliaire et facilite donc les infections respiratoires.

A noter que l'hypersécrétion de mucus et l'hyperplasie sécrétoire, si elles correspondent à des caractéristiques communes des maladies respiratoires chroniques comme les dyskinésies ciliaires, la mucoviscidose, l'asthme ou la BPCO (Cohn, 2006), apparaissent davantage comme des effets secondaires de ces pathologies dont les étiologies impliquent avant tout des processus inflammatoires : dans l'asthme, une inflammation plutôt médiée par des cellules Th2 en réponse notamment à un allergène et conduisant à une éosinophilie ; dans la mucoviscidose ou dans la BPCO, une inflammation associée à une réponse inflammatoire neutrophilique probablement induite par une infection microbienne ou un stress (e.g. molécules toxiques, fumée de cigarette). La recherche de nouveaux acteurs clés dans ce contexte est nécessaire pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant la restauration des cils motiles fonctionnels à la surface des cellules épithéliales respiratoires et donc une clairance mucociliaire efficace.

1) Les Dyskinésies Ciliaires Primitives

Les Dyskinésies Ciliaires Primitives (DCP) ou « syndrome des cils immobiles » sont des pathologies autosomiques récessives qui touchent directement à l'intégrité ou la fonctionnalité du cil motile. A l'heure actuelle, plus d'une vingtaine de protéines différentes ont été impliquées dans les DCP. Le diagnostic de cette pathologie nécessite des mesures structurales et de motilité des cils qui sont particulièrement lourdes et délicates à mettre en œuvre (microscopie électronique, vidéomicroscopie,...). Par ailleurs, un dépistage génétique de cette maladie peut être effectué bien qu'au vu de la quantité importante de protéines entrant la biogénèse des cils motiles, de nombreuses mutations restent sûrement encore à être découvertes. D'un point de vue génétique, les mutations sont retrouvées sur des gènes codant pour les dynéines internes ou externes, constituant les moteurs moléculaires nécessaires à la motilité des cils (Merveille et al., 2011; Mitchison et al., 2012; Panizzi et al., 2012). Deux gènes, DNAL1 et DNAH5, codant pour des dynéines du bras externes, expliquent à eux seuls près de la moitié des cas de DCP (Mazor et al., 2011; Olbrich et al., 2002). L'implication de la mutation DNAH5 dans l'apparition de *situs inversus* a été identifiée par Olbrich et collègues (Olbrich et al., 2002). Les patients DCP développent des infections respiratoires, une infertilité masculine et la présence dans 50% des cas de *situs inversus* (syndrome de Kartagener). L'asymétrie droite-gauche lors de l'organogenèse est liée à la distribution anormale des organes internes et des viscères qui s'établit en fonction du flux liquidien à l'intérieur de la cavité blastocélique. Une inversion du sens de rotation du liquide aboutit à un *situs inversus* chez 50% des patients atteints de DCP. Ces patients présentent des infections respiratoires à répétition liés aux défauts de clairance mucociliaire et à l'absence de motilité des cils motiles des voies respiratoires. La « stagnation » du mucus favorise la colonisation microbienne au niveau des voies respiratoires, et aboutit *in fine* à des insuffisances respiratoires. Ces symptômes sont très proches de ceux observés dans la mucoviscidose (cf. partie II. 3. A. 2)). D'ailleurs, les nombreux progrès médicaux réalisés dans le domaine de la mucoviscidose ont pu être mis à profit pour mieux soigner les symptômes respiratoires des patients DCP. L'apparition des premiers symptômes respiratoires est très variable, du fait probablement dans la grande variabilité génotypique. Le plus souvent, les patients consultent pour des problèmes respiratoires chroniques, et le diagnostic de la DCP peut être conforté par la présence d'un *situs inversus*.

2) La mucoviscidose

La mucoviscidose, ou Cystic Fibrosis (CF), est la plus fréquente des maladies héréditaires autosomiques récessives graves dans les populations d'origine européenne, avec une incidence d'environ une naissance sur 2500 (Navarro et al., 2001). En France, environ 250 nouveaux cas de mucoviscidose avérés sont pris en charge chaque année. Ceci permet d'évaluer à environ 6000 le

nombre actuel de patients atteints en France. Statistiquement, une personne sur 25 en moyenne serait porteuse d'une mutation à l'état hétérozygote (dit « porteur sain »), ce qui correspond à plus de deux millions de personnes soit environ 5% de la population générale en France. Cependant, la fréquence de l'affection varie selon l'origine géographique et ethnique des patients. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. En l'absence de traitement palliatif, la médiane de survie est de 3 à 5 ans. La rapidité du diagnostic est donc décisive car la précocité des soins et de la prise en charge du malade par une équipe médicale spécialisée permet d'éviter l'apparition de lésions irréversibles. C'est un facteur essentiel qui permet d'augmenter considérablement la qualité et l'espérance de vie des malades qui est estimée actuellement à environ 47 ans. En 1989, une équipe américano-canadienne a identifié le gène responsable de la mucoviscidose. Ce gène, dénommé CFTR pour Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, code pour la protéine CFTR, un canal Cl^- appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Son activité de canal Cl^- est régulée par des phosphorylations majoritairement par la protéine kinase dépendant de l'AMPc (PKA), mais aussi par d'autres kinases comme les PKC ou PKG (Billet and Hanrahan, 2013). Par ailleurs, son fonctionnement nécessite la fixation et l'hydrolyse de molécules d'ATP au niveau de ses deux domaines de liaison à l'ATP (Akabas, 2000). Une fois activé, le canal CFTR s'ouvre et permet le passage sélectif d'anions (Cl^- mais aussi iodure, bromure, et bicarbonate), jusqu'à son inactivation par déphosphorylation *via* des phosphatases (Gadsby and Nairn, 1999a; Gadsby and Nairn, 1999b). Dans la mucoviscidose, la mutation de ce canal conduit à sa dysfonction et à une altération des transports d'ions Cl^- mais aussi à une perturbation associée des transports d'autres molécules. Ces défauts se manifestent principalement au niveau des épithéliums et des glandes exocrines, lieux où le canal CFTR se retrouve principalement exprimé (Davis and Cowley, 2006; Kreda et al., 2012). A l'origine considérée comme une maladie monogénique, il s'avère aujourd'hui que la mucoviscidose est une maladie complexe impliquant de nombreuses mutations du gène *cftr* (plus de 2000 à l'heure actuelle). Des gènes modificateurs, et d'autres facteurs sont à considérer qui contribuent à des tableaux cliniques complexes, où des mutations identiques peuvent aboutir à des présentations différentes de la maladie (Bombieri et al., 2000).

Bien que n'étant pas l'objet central de mon travail de thèse, la mucoviscidose étant associée à des défauts importants de clairance mucociliaire et de réparation tissulaire (Donaldson et al., 2007; Livraghi and Randell, 2007), nous avons choisi d'effectuer des études comparatives entre un épithélium « normal » et un épithélium CF au cours du processus de différenciation. C'est pourquoi j'ai choisi au cours de cette introduction de détailler brièvement cette pathologie respiratoire. Je n'évoquerai pas ici la physiopathologie liée au dysfonctionnement du canal CFTR mais je m'attarderai

plutôt sur les défauts de liquide de surface des voies respiratoires, de la réparation du tissu respiratoire CF et sur les modèles animaux développés pour étudier la mucoviscidose.

a. Modifications du liquide de surface

Dans les voies respiratoires, une des conséquences majeures des perturbations ioniques provoquées par l'absence ou la dysfonction de CFTR est un épaissement et une augmentation de viscosité du mucus, probablement dues à une déshydratation et une réduction concomitante de la hauteur du LPC (Boucher, 2007a; Boucher, 2007b; Button et al., 2012). En conséquence, les cils motiles se retrouvent écrasés, affectant leur battement et donc la clairance mucociliaire. Le mucus plus visqueux, et difficilement évacué par une clairance mucociliaire réduite, va devenir un nid propice aux infections par de nombreux pathogènes (*Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, *Hemophilus Influenzae*, *Aspergillus*). Ces états infectieux chroniques sont inévitablement associés à un état inflammatoire récurrent caractérisé notamment par une infiltration de neutrophiles, ainsi qu'à une insuffisance respiratoire chronique, principale cause de mortalité et de morbidité chez les patients CF (Heijerman, 2005). Dans la mucoviscidose, une des principales questions encore en suspens est de savoir si l'état inflammatoire du tissu respiratoire précède l'infection ou alors si elle n'en est que la résultante. Comme nous l'avons vu plus haut (cf. partie II. 2. J. 4)), l'épithélium respiratoire sécrète de nombreuses molécules anti-microbiennes qui sont sensibles aussi bien aux concentrations extracellulaires de Na^+ et de Cl^- qu'au pH (Pezzulo et al., 2012). L'installation de niches microbiennes au niveau des voies respiratoires CF et la susceptibilité des patients CF à développer des infections respiratoires chroniques pourraient aussi impliquer une déficience de l'activité anti-microbienne de ces molécules en conséquence d'une composition altérée (pH acide et concentrations en Na^+ , Cl^- modifiées) du LPC due aux défauts de CFTR et des transports d'ions (cf. figure 22). En accord avec cette hypothèse, une étude récente a montré à partir d'un modèle porcin de mucoviscidose (Rogers et al., 2008b), que le liquide de surface des voies respiratoires était diminué et plus acide chez le cochon CF, et que l'activité antimicrobienne était inhibée par cet acidification du mucus (Pezzulo et al., 2012). Cela aurait pour conséquence de favoriser la colonisation des poumons par certains pathogènes comme *Pseudomonas Aeruginosa*. Cette étude suggère qu'un traitement permettant de restaurer le pH du liquide de surface à un niveau physiologique pourrait permettre de retrouver une activité anti-microbienne naturelle des voies respiratoires CF. En accord avec cette hypothèse, certaines études mettent en avant une perte d'efficacité de certains antibiotiques à des pH plus acides, ce qui peut poser un problème d'efficacité de traitements antimicrobiens dans la mucoviscidose (Moriarty et al., 2007).

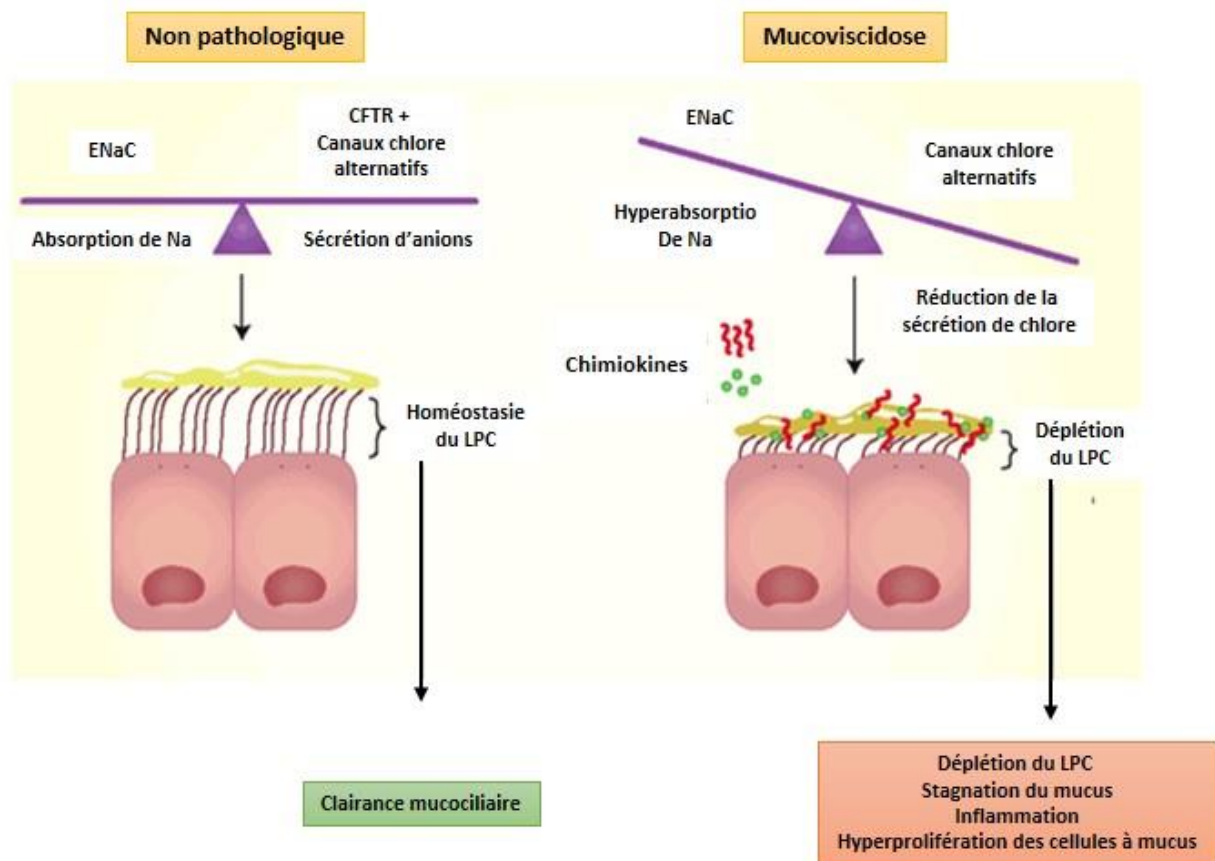


Figure 22: Modèle de la mucoviscidose et impact sur la clairance mucociliaire (d'après Frizzell et Pilewski, 2004)

Les transports hydro-électrolytiques permettent de maintenir l'équilibre entre l'absorption de Na et la sécrétion d'anions nécessaire pour l'homéostasie du liquide péréciliaire (LPC), permettant une clairance mucociliaire efficace. Lors de la mutation du canal CFTR chez les patients CF, la réduction de la sécrétion de chlore induit une perte de l'équilibre entre l'absorption de Na et la sécrétion d'anions. Une des résultantes directe est une déplétion du liquide péréciliaire impactant la clairance mucociliaire. La stagnation du mucus favorise les infections et les phénomènes inflammatoires et donc à la sécrétion de chimiokines. Ce changement de contexte induit un remodelage de l'épithélium respiratoire caractérisé par une hyperprolifération des cellules à mucus avec une perte des cellules multiciliées.

b. Remodelage de l'épithélium de surface

Les infections répétées du tissu respiratoire conduisent à sa destruction progressive associée à une fibrose pulmonaire et à un remodelage de l'épithélium. L'épithélium respiratoire CF est caractérisé par une hyperplasie sécrétoire caractérisée par une augmentation massive du nombre de cellules à mucus ainsi qu'une métaplasie squameuse, aboutissant à une perte progressive des cellules multiciliées (Gilljam et al., 1987; Tiddens et al., 2000; Voynow et al., 2005). A l'heure actuelle les facteurs entraînant ce remodelage épithélial sont peu connus. A partir d'un modèle de xénogreffe chez la souris, Coraux et collaborateurs n'ont pas observé de différences majeures de différenciation entre un épithélium respiratoire contrôle et un épithélium CF. Cependant, la prolifération plus rapide des cellules basales CF révèle le caractère hyperprolifératif et hyperplasique des cellules basales CF (Voynow et al., 2005). De manière intéressante un agent pharmacologique correcteur du canal CFTR (VRT-325) permet de restaurer leur prolifération à un état proche de celui observé dans les cellules non-CF (Trinh et al., 2012).

c. Modèles animaux d'étude de la mucoviscidose

La souris a été pendant les 20 dernières années un modèle important pour l'étude de la mucoviscidose, l'obtention du premier modèle murin de la mucoviscidose ayant même fourni une des premières preuves de concept sur la modélisation de maladies génétiques humaines. Bien que ces modèles soient fastidieux à mettre en place et que les processus de différenciation en phénotype multicilié soit plus longs que chez d'autres organismes modèles, ils possèdent de fortes similitudes de fonction et de composition avec l'épithélium respiratoire humain et représentent ainsi un avantage incontournable pour l'étude des pathologies respiratoires humaines. La première souris invalidée pour le gène *cfr* a été générée en 1992 (Clarke et al., 1992; Snouwaert et al., 1992). Cependant, des phénotypes différents ont été obtenus, en fonction des fonds génétiques et des mutations étudiées (Colledge et al., 1995; Dorin et al., 1992a; Dorin et al., 1992b; Hasty et al., 1995; Ratcliff et al., 1993; Rozmahel et al., 1996). L'écueil principal du modèle CF murin est que les souris développent principalement des atteintes intestinales, mais pas ou peu d'atteintes pulmonaires (Grubb and Boucher, 1999). En revanche, elles développent des obstructions digestives majeures (ileus meconial) entraînant la mort prématurée des souriceaux probablement avant même l'apparition des premiers symptômes respiratoires (Kent et al., 1997). Il a été proposé que l'expression d'autres canaux Cl^- dans les poumons de souris puisse compenser l'absence ou la dysfonction de CFTR et éviter l'apparition de phénotypes pulmonaires CF chez la souris (Boucher, 1999). Ces difficultés ont contraint la communauté scientifique à chercher à élaborer de nouveaux modèles animaux de la mucoviscidose. Le modèle porcin apparaît comme une alternative crédible à la souris pour l'étude de la mucoviscidose. Le porc présente un appareil respiratoire assez comparable à l'Homme (McLaughlin et al., 1966). Il y a

quelques années, un modèle porcin portant la délétion du canal CFTR a été mis au point (Rogers et al., 2008a; Rogers et al., 2008b). Ce modèle présentent des symptômes semblables à l'Homme (Welsh and Smith, 2001) : une obstruction intestinale (iléus méconial), la destruction pancréatique exocrine, la présence de « cirrhose » biliaire focale, anomalies des canaux déférents et symptômes respiratoires (Meyerholz et al., 2010; Ostedgaard et al., 2011; Pierucci-Alves et al., 2011; Rogers et al., 2008b).

3) *Asthme et BPCO*

L'asthme et la BPCO, sont deux pathologies respiratoires d'étiologie souvent différentes mais semblables sur certains points et ayant une incidence très élevée dans les pays développés et en voie de développement. Comme nous allons le voir, elles présentent de nombreuses caractéristiques communes avec notamment une inflammation du tissu respiratoire et un remodelage de l'épithélium respiratoire aboutissant à la perte des cellules multiciliées et donc de la clairance mucociliaire. Des analyses de coupes pulmonaires de patients indiquent des caractéristiques spécifiques à chacune des deux pathologies. Ainsi, l'asthme se caractérise par une inflammation excessive du tissu respiratoire en réponse à certains allergènes, alors que la BPCO est dû à une réaction inflammatoire à la suite de contact avec certains agents chimiques, comme la fumée de cigarette. Ces différentes localisations ainsi que les facteurs déclenchant ces pathologies respiratoires, peuvent potentiellement refléter la différence immunologique à l'origine de ces pathologies respiratoires. Tout d'abord, les inflammations du tissu respiratoire observées dans l'asthme affectent les voies proximales avec dans le cas d'asthmes sévères des inflammations au niveau alvéolaire, cependant le parenchyme pulmonaire n'est pas affecté. De manière très différente, les BPCO sont caractérisées par l'inflammation des tissus respiratoires au niveau alvéolaire mais aussi au niveau du parenchyme pulmonaire débouchant sur des emphysèmes pulmonaires. Cependant, certains patients atteints de BPCO présentes des évidences d'inflammation au niveau plus proximal. Au niveau immunologique, ces pathologies respiratoires sont dues à une exacerbation de la réponse lymphocytaire. Dans l'asthme on observe une exacerbation de la réponse lymphocytaire de type II. Lors du contact avec des allergènes, le patient asthmatique développe une sensibilité accrue aux IgE activant les mastocytes. Les mastocytes ainsi activés relâchent de nombreux facteurs broncho-constricteurs comme certaines prostaglandines et certains activateurs des lymphocytes Th2. Les lymphocytes Th2 jouent un rôle central dans l'inflammation associé à cette pathologie avec la sécrétion des interleukines IL-4, IL-5 (inflammation induite par les éosinophiles) et IL-13 qui d'une part stimulent la production d'IgE par les lymphocytes B et d'autre part induisent l'hyperplasie sécrétoire (Shim et al., 2001; Turner et al., 2011; Tyner et al., 2006). La production excessive d'IgE initialise un cercle vicieux participant à l'exacerbation de la maladie, qui se traduit chez les patients par une infiltration important de mastocytes dans le tissu respiratoire. L'origine

immunologique chez les patients atteints de BPCO est très différente. A la suite de lésions de l'épithélium respiratoire, une étape de réparation et de réépithélisation se met en place afin que le tissu retrouve sa fonction biologique. Les cellules épithéliales sécrètent alors de nombreux facteurs dont le TGF permettant leur migration afin de repeupler le lit de la blessure. Néanmoins, une surexposition au TGF peut parfois conduire à une transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses par un mécanisme de transition épithelio-mésenchymateuse (EMT). Le TGF est par exemple sécrété en réponse à l'inhalation de la fumée de cigarette favorisant une EMT. Dans des situations pathologiques, on assiste à une apparition progressive de foyer fibroblastiques qui *in fine* débouche sur une fibrose du tissu respiratoire. Au niveau immunitaire, les macrophages sont fortement activés et induisent au niveau du tissu respiratoire le recrutement de neutrophiles, d'éosinophiles et de lymphocytes de type Th1. L'ensemble est à l'origine de l'hyperplasie sécrétoire et via leur activation, de la sécrétion de certaines protéase (MMP9 par exemple). Dans les patients atteints de BCPO il est retrouvé de forte quantité de métalloprotéines et de protéase neutrophiles à l'origine de la dégradation de l'élastine. L'élastine permet l'expansion alvéolaire lors de l'inspiration et la compression alvéolaire lors de l'expiration. Sa dégradation est à l'origine des emphysèmes pulmonaires. Dans ces deux pathologies respiratoires on assiste à un remodelage complet de l'épithélium respiratoire caractérisé par la perte des cellules multiciliées au profit d'une hyperplasie sécrétoire. La perte des cils motiles abolit ainsi la clairance mucociliaire et donc la défense des voies respiratoires, conduisant à une exacerbation de la pathologie respiratoire par l'exposition à de nouveaux pathogènes. Dans ce contexte l'identification d'acteurs clé mis en jeu au cours de la différenciation des cellules multiciliées, qui a fait l'objet de mon travail de thèse, vise la mise en place de thérapies régénératrice des cellules multiciliées et donc de la clairance mucociliaire. La restauration d'une clairance mucociliaire fonctionnelle via ces thérapies régénératrices de l'épithélium respiratoire, permettrait un meilleur contrôle de ces pathologies respiratoires.

4) *Caractéristiques de l'épithélium respiratoire chez la souris.*

Il est toutefois important de noter certaines différences entre l'homme et la souris au niveau des voies respiratoires. Par exemple, l'étude de la ciliogénèse chez la souris dépend de l'âge de la souris : Toskala et collègues indiquent clairement que le pourcentage de cellules multiciliées varient en fonction de l'âge et de la localisation dans les voies respiratoires (Toskala et al., 2005). A l'âge adulte le pourcentage de cellules multiciliées est stable et comme chez l'Homme diminue plus on avance dans l'arbre bronchique. De plus, une autre étude indiquent des variations de taille, et de battement ciliaire dépendant de l'âge de la souris avec de manière indirecte une clairance mucociliaire variable en fonction de l'âge (Francis et al., 2009). A travers ces deux études et de précédentes études (Mercer et

al., 1994; Pack et al., 1980), on remarque des variations de pourcentage des différents types cellulaires dépendant aussi de la souche de souris utilisée. Une autre particularité de la souris est la présence des cellules Club dans l'ensemble des voies respiratoires, y compris dans la trachée, alors qu'elles en sont absentes chez l'homme (Boers et al., 1999; Reynolds et al., 2002). La proportion des cellules Club est très fortement surreprésentée dans les voies respiratoires de la souris par rapport à de nombreuses autres espèces (Pack et al., 1980). Malgré ces différences, la souris représente un modèle pertinent pour comprendre les mécanismes et l'impact sur la ciliogénèse de certaines protéines cibles au niveau de nombreux organes, et dans lequel il peut être intéressant de tester certaines hypothèses à l'aide de modèles animaux disponibles. Plusieurs modèles de souris ont émergées au cours des dernières années qui permettent d'avoir à disposition des modèles d'études adaptés pour l'étude de certaines ciliopathies impliquées affectant les cils motiles.

Ainsi les modèles murins et les modèles *in vitro*, développés sont indispensables pour mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques des maladies associés aux défauts ciliaires. Néanmoins, ces modèles présentent certains inconvénients comme par exemple la durée nécessaire à la différenciation multiciliée (plusieurs semaines). Dans cette perspective, d'autres modèles animaux, comme par exemple le poisson zèbre et le xénope, sont rapidement apparus comme des modèles pertinents de la ciliogénèse. La manipulation de ces modèles est facilement réalisable, et les études effectuées dans un organisme entier permettent l'étude dans un tissu spécifique de processus développementaux similaires à ceux qu'on observe chez l'Homme. Tout cela peut de plus être réalisé dans un laps de temps beaucoup plus réduit.

B. Modèles d'études de la ciliogénèse

1) Le poisson zèbre (*zebrafish*)

Au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre, plusieurs organes disposant de cellules ciliées ont été mis en évidence. La longueur, la densité et la motilité des cils ont ainsi été analysées dans le canal du pronephros, la vésicule de Kupffer (KV), les neurones du système sensoriel (placodes olfactives) (cf. figure 23). La motilité des cils dans ces organes est importante pour le mouvement de fluide (Kramer-Zucker et al., 2005) et la fonction des organes (cf. pour revue (Malicki et al., 2011)). Le poisson zèbre se prête facilement à des manipulations génétiques.

a. Le pronephros

Le pronephros constitue l'organe de filtration (équivalent du rein) chez l'embryon de poisson zèbre. Au cours du développement, le pronephros provient du mésoderme intermédiaire. Des défauts

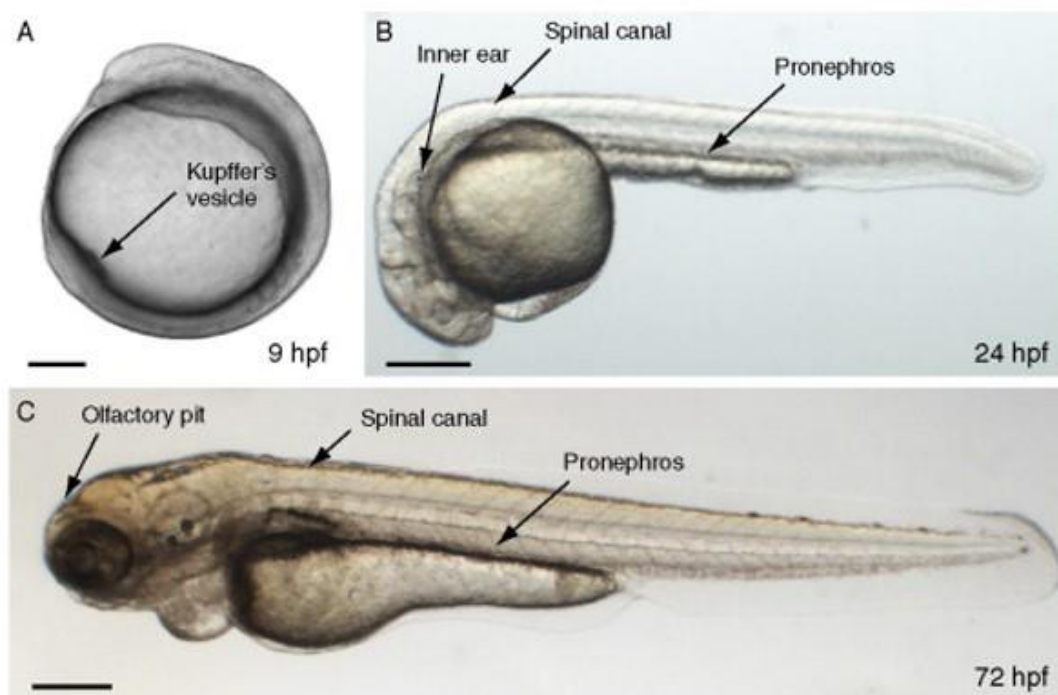


Figure 23: Les différents organes possédant des cils chez le poisson zèbre

Les images en A., B. et C. représentent différentes phase du développement embryonnaire du poisson zèbre, repérée par le temps après fécondation et noté en bas à droite (hpf: heure post fécondation).

- A. 9 hpf, lors de l'organogenèse, la vésicule de Kupffer (Kupffer's vesicle) arbore un cil motile comme indiqué par la flèche. Ce cil est nécessaire pour l'asymétrie droite/gauche.
- B. 24 hpf, différents organes se forment et les cils y jouent un rôle important. Dans le pronéphros qui constitue le rein primitif on retrouve deux type de cils: un cil unique non motile et des cellules multiciliées pourvues de motilité. Dans l'oreille interne (inner ear) on retrouve un cil mécanosensorielle unique. Dans le canal spinal on retrouve un cil motile unique similaire à celui retrouvé dans la vésicule de Kupffer et nécessaire pour la circulation des fluides.
- C. 72 hpf il y a apparition d'un cil sensoriel à la surface apicale des neurones sensoriels dans les placodes olfactives (Olfactory pit).

ciliaires dans les cellules épithéliales rénales sont fréquemment associées à la formation de kystes rénaux à la fois chez le poisson zèbre et chez les mammifères. Le canal pronéphrique est doté de deux populations de cellules ciliées (Neugebauer et al., 2009): les cellules multiciliées (MCC : multiciliated cells) qui forment des faisceaux de cils en « cluster » et les cellules ciliées uniques (SCC : single ciliated cells) qui ne forment que des cils uniques (Liu et al., 2007). Les cils du pronéphros des deux types cellulaires montrent une configuration en MT « 9 + 2 », c'est-à-dire qu'ils contiennent une paire centrale de MT et des bras de dynéines caractéristiques des cils mobiles (Kramer-Zucker et al., 2005; Liu et al., 2007; Pathak et al., 2007). Alors que les MCC et les SCC peuvent être retrouvées dans le segment antérieur et au milieu du canal pronéphrique, la partie postérieure du canal contient uniquement des SCC. De manière intéressante on retrouve le facteur de transcription Foxj1 exprimé spécifiquement dans les cellules multiciliées du pronéphros (Aamar and Dawid, 2008). Ce modèle se révèle particulièrement intéressant pour l'étude des mécanismes de spécification et de différenciation de cellules multiciliées (Drummond, 2003).

b. La vésicule de Kupffer (VK)

La vésicule de Kupffer (VK) est une structure sphérique transitoire et fermée, intégrée sur la face ventrale du bourgeon caudal de l'embryon (pour revue : (Malicki et al., 2011)). Il contient une lumière remplie de liquide bordée de cellules épithéliales ciliées qui sont dérivées de cellules précurseurs dorsales (Cooper and D'Amico, 1996; Oteiza et al., 2008). Bien que son origine développementale et sa structure soient assez distinctes du nœud embryonnaire de souris, il joue un rôle similaire dans la mise en place de l'asymétrie droite/gauche de l'embryon (Bisgrove et al., 2005; Essner et al., 2005). En revanche, les mécanismes de genèse des cils sont similaires dans la VK et dans le nœud embryonnaire (McGrath and Brueckner, 2003; Nonaka et al., 2002; Nonaka et al., 1998). En conséquence, la VK représente un excellent système pour évaluer la morphologie et la motilité des cils, ainsi que les conséquences fonctionnelles des anomalies ciliaires. La VK contient à la fois des cils motiles et non-motiles, et la plupart des cellules de la VK ne contiennent qu'un cil unique.

c. Les organes sensoriels

Comme chez d'autres vertébrés, y compris les mammifères, les organes sensoriels du poisson zèbre contiennent de nombreux cils appelés cils sensoriels (cf pour revue (Malicki et al., 2011)). Ceux-ci sont présents aussi bien à la surface apicale des neurones sensoriels comme les photorécepteurs de la rétine, les cellules olfactives des placodes olfactives et les cellules mécanosensorielles de l'oreille interne (Tsujikawa and Malicki, 2004). Sur le plan structural, les cils olfactifs du poisson zèbre montrent à la fois une configuration de MT « 9 + 0 » et « 9 + 2 ». L'oreille interne du poisson zèbre, comme chez d'autres vertébrés, est composée de canaux interconnectés et de chambres contenant des plaques de

cellules mécanosensorielles ciliées (Bang et al., 2001; Haddon and Lewis, 1996; Whitfield et al., 1996). Les cellules ciliées comportent un long cil apical appelé le kinocil. Adjacents au kinocil, les cellules ciliées disposent d'un ensemble de saillies apicales formant une rangée de cils plus petits appelées les stéréocils. Il est à noter que le terme de stéréocil ne correspond pas réellement à une structure ciliée typique, puisque les stéréocils s'appuient en réalité sur un cytosquelette d'actine et seraient donc plus semblables à des microvillosités plutôt qu'à des cils. Chez le poisson zèbre, les kinocils des cellules ciliées sont maintenus tout au long de l'âge adulte et pourraient donc jouer un rôle dans l'audition (Bang et al., 2001; Haddon and Lewis, 1996).

2) *Le xénope*

Le xénope est un amphibien appartenant au groupe des deutérostomes et à l'embranchement des tétrapodes, possédant une symétrie bilatérale, caractérisée par deux axes : antéro-postérieur et dorso-ventral. Au cours de l'embryogenèse (cf. figure 24), trois grandes étapes jalonnent ce processus: 1) La segmentation, correspond à la phase de clivages de l'embryon. 2) La gastrulation, correspond à un ensemble de mouvements cellulaires aboutissant au positionnement des trois feuillets embryonnaires : un feuillet externe (ectoderme) à l'origine de l'épiderme et du tube neural ; un feuillet interne (endoderme) à l'origine du tube digestif et des épithéliums bordant le tube digestif et les voies respiratoires; un feuillet intermédiaire (mésoderme) notamment à l'origine de la notochorde, des muscles et du sang. 3) La neurulation correspond au processus morphogénétique qui conduit à la formation du tube neural par repliement de l'ectoderme neural. Tout au long de ces étapes, les divisions cellulaires et les mouvements morphogénétiques sont accompagnés de mécanismes moléculaires qui assurent la régionalisation de l'embryon.

a. *L'épiderme embryonnaire de xénope*

L'épiderme représente une structure résistante, élastique et imperméable qui protège l'organisme contre la déshydratation, les blessures et les infections. Le xénope possède une peau très différente de celle des vertébrés terrestres. En effet, elle ne possède pas d'appendice comme les follicules pileux, recouverte en revanche d'un mucus antibactérien et antifongique, protégeant l'animal. Celui-ci est sécrété par des cellules sécrétrices de mucus et des ionocytes (ces dernières sont aussi baptisées cellules éparpillées de par leur répartition irrégulière). Ce mucus est ensuite distribué à la surface par les cellules multiciliées composées de plusieurs centaines de cils motiles. L'épiderme d'embryon de xénope et l'épithélium respiratoire de mammifères partagent ainsi certaines caractéristiques qui en font deux modèles d'études adaptés pour réaliser des études comparées de ciliogenèse (Billett and Gould, 1971; Hayes et al., 2007). Il n'existe cependant pas une équivalence

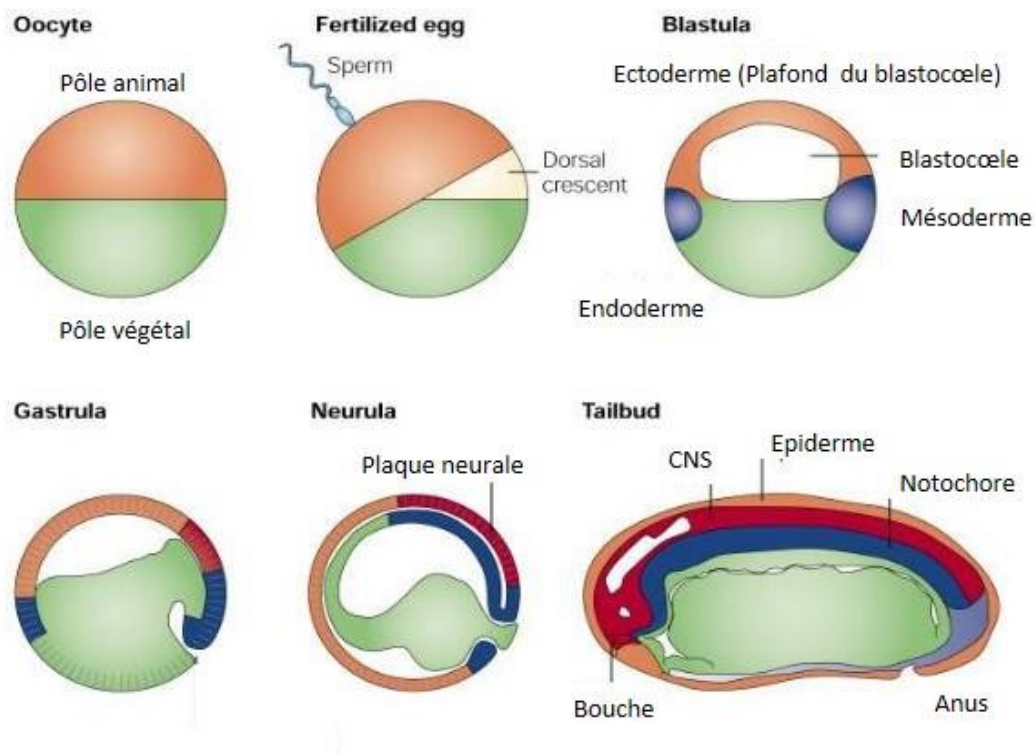


Figure 24: Le développement embryonnaire du xénope

L'oocyte est divisé en un pôle animal et un pôle végétatif. Après fécondation, le croissant gris apparaît de manière opposée au point d'entrée du spermatozoïde. Les divisions commencent et le blastocœle se forme (stade blastula) avec la formation des trois feuillets embryonnaires: l'ectoderme (orange), le mésoderme (bleu) et l'endoderme (Vert). Au stade gastrula les mouvements des trois feuillets conduit au plan du corps. L'ectoderme donne naissance à l'ectoderme neuronal et l'ectoderme non neuronal. L'ectoderme neuronal donnera la plaque neurale au stade neurula puis le système nerveux central (CNS) au stade bourgeon caudal (dit « tailbud »). L'ectoderme non neuronal permettra la formation de l'épiderme de l'embryon de *Xenopus* où on retrouve un épithélium mucocilié. Une partie des organes internes dérive du mésoderme, et de l'endoderme dériveront les épithéliums bordant les organes ainsi que le tube digestif.

totale entre les 2 modèles : par exemple, l'épiderme embryonnaire de xénope possède une plus forte proportion de cellules sécrétrices de mucus (environ 60% des cellules épithéliales), et une moindre proportion de cellules ciliées (environ 16%) qui disposent également d'un moindre nombre de cils par cellule (Dubaissi and Papalopulu, 2011). L'accessibilité de la peau du xénope, une relative conservation des types cellulaires et la possibilité d'effectuer des études moléculaires *in vivo* en font globalement un puissant modèle d'étude pour comprendre la formation et la réparation des épithéliums mucociliaires. L'embryon d'amphibien a été très largement utilisé dans le champ de l'embryologie expérimentale. L'épiderme d'embryon d'amphibien a été un des tous premiers exemples observés de tissu contenant un flux directionnel de fluide dirigé par des cils. Depuis ces premières observations, des outils expérimentaux disponibles chez le xénope ont permis d'en faire un modèle performant pour l'étude de la différenciation des cellules multiciliées (voir pour revue (Werner and Mitchell, 2012; Werner and Mitchell, 2013). Au début de la gastrulation, l'épiderme est composé de deux couches cellulaires : une couche externe et une couche interne. Ces deux couches sont issues d'une couche initiale unique au stade des clivages. Les cellules de cette couche subissent des divisions dans le plan de l'épithélium (horizontales) ou perpendiculaires à ce plan (verticales). Dans le second cas, une des cellules filles se situent dans la couche externe, l'autre dans la couche interne. Ce type de division s'accompagne de la ségrégation asymétrique des déterminants, PAR-1 (partitioning-defective 1) (interne) et aPKC (atypical protéine kinase C) (externe). La distribution polarisée de ces déterminants conditionne la nature des types cellulaires naissant dans les deux couches. Ainsi, PAR-1 dans la couche interne autorise la spécification des progéniteurs des ionocytes et des cellules multiciliées. A l'inverse, PKC empêche ces types cellulaires de naître dans la couche externe et autorise la naissance des progéniteurs des cellules à mucus. En aval des déterminants PAR-1 et PKC, la voie Notch intervient pour réprimer la spécification des progéniteurs des ionocytes et des cellules multiciliées dans la couche interne (cf. partie III. 2. A. 4)). A la fin du processus de différenciation de l'épiderme, les trois types cellulaires décrits plus haut se trouvent dans la couche externe par un processus d'intercalation pendant la neurulation. Une fois intercalées, les cellules multiciliées voient leurs cils réorientés selon un axe unique, de façon à produire un flux directionnel efficace. Ce phénomène fait appel à plusieurs composants de la voie « planar Cell Polarity » (PCP) (cf. partie III. 3. B) (Kim et al., 2010).

b. Néphrostomes

A l'instar du poisson zèbre, on retrouve aussi dans l'embryon de xénope des cellules multiciliées au niveau des néphrostomes. Ceux-ci sont des structures dont la face interne est constituée de cellules multiciliées et qui participent à la formation du système pronéphrotique (Vize et al., 1995; Wessely and Tran, 2011). Le pronéphros de xénope est un organe simple constitué de trois

composants : un glomus qui filtre les déchets à partir du sang vers le coelome, les néphrostomes qui forment un système tubulaire reliant le coelome par l'intermédiaire de structures fines en entonnoir et tapissées sur la face interne par des cellules multiciliées. Pour finir un canal qui transporte les déchets des tubules au cloaque pour être excrétés.

c. Gastrocoel roof plate

De manière similaire à la vésicule de Kupffer chez le poisson zèbre ou du nœud embryonnaire chez les mammifères, le xénope possède une structure apparentée dénommée le « gastrocoel roof plate » constitué de cellules monociliées, c'est-à-dire ne possédant qu'un cil motile unique et dont le rôle est d'assurer l'asymétrie droite/gauche de l'embryon lors de la gastrulation (Schweickert et al., 2007). De manière intéressante, ces modèles d'études ont permis de confirmer que le facteur de transcription FOXJ1, indispensable à la différenciation des cellules multiciliées (You et al., 2004), est aussi impliqué dans la formation de cil motile unique chez le poisson zèbre et chez le xénope (Pohl and Knochel, 2004; Stubbs et al., 2008). FOXJ1 était décrit comme spécifique des cellules multiciliées. Cependant de plus récents travaux indiquent que FOXJ1 serait en réalité indispensable pour induire un cil motile. Dans ces conditions, d'autres facteurs seraient aussi impliqués dans la multiplication des corps basaux nécessaires à la mise en place des cellules multiciliées (Stubbs et al., 2008). C'est dans ce contexte, que l'objectif majeur de mon travail de thèse a été de déterminer de nouveaux acteurs clés participant à la biogénèse des cils motiles (cf. partie Résultats).

Sous ces différents aspects, les modèles du xénope et du poisson zèbre apparaissent comme une plateforme *in vivo* intéressante pour l'étude comparée de la ciliogenèse.

En dépit d'une accumulation importante de résultats, notre connaissance des nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'établissement des cils au sein d'une cellule et dans un tissu spécifique reste encore très parcellaire. Au commencement de mon travail de thèse, les microARN sont apparus comme de nouveaux régulateurs majeurs de l'expression génique impliqués dans de nombreux processus biologiques. Nous avons ainsi été les premiers à étudier le rôle de ces microARN dans la différenciation des épithéliums multiciliés. Afin de pouvoir présenter ces résultats, j'aborderai dans la partie suivante les mécanismes de la régulation de l'expression génique par les microARN, leur biogenèse ainsi que leurs liens récents avec les pathologies respiratoires.

III. Les microARN comme effecteurs des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la différenciation des épithéliums multiciliés.

1. Les microARN

Depuis leur découverte en 1993, l'implication des microARN dans un grand nombre de processus complexes a pu être établie. Leur capacité à contrôler de manière directe plusieurs cibles et, ce faisant, plusieurs voies de signalisation, les placent comme des modulateurs importants de la signalisation cellulaire. Par la suite les microARN seront notés miARN ou miR dans le cas d'un microARN particulier.¹

A. Historique

En parallèle des travaux effectués sur l'ARN interférence par Craig Mello et Andrew Fire (Fire et al., 1998), des recherches menées chez *C. elegans* ont permis de mettre en évidence pour la première fois l'existence de petits ARN non codants endogènes qui contrôlaient l'expression génique. Le premier miARN, lin-4, a été découvert simultanément chez le nématode *C. elegans* par les équipes de Victor Ambros (Lee et al., 1993) et de Gary Ruvkun (Wightman et al., 1993).

Le développement larvaire de *C. elegans* est finement contrôlé par des gènes hétérochroniques au cours de 4 stades larvaires (notés L1 à L4), déterminant la spécification temporelle des événements dans différentes lignées cellulaires post-embryonnaires (Ambros, 1989; Ambros and Horvitz, 1984; Ambros and Horvitz, 1987). Ambros avait déjà caractérisé certains gènes hétérochroniques, notamment lin-4, lin-14 et lin-28 dont les mutants induisaient des phénotypes larvaires dont le contrôle temporel du développement était associé à un développement anormalement précoce d'événements larvaires dits « tardifs », ou à un développement tardif d'événements normalement précoces (Ambros, 1989; Ambros and Horvitz, 1984; Chalfie et al., 1981).

Chez *C. elegans*, lin-14 est présent dès le début du développement larvaire puis disparaît à la fin du stade L1 lors de l'induction de lin-4 (Rougvie, 2001). La perte de fonction de lin-14 induit un phénotype caractéristique associant la perte du stade L1 et une différenciation associée au stade L2. Cependant la larve suit un développement jusqu'au stade adulte alors que des expériences de gain de fonction induisent un blocage au stade L1 (Ambros and Horvitz, 1984). Au contraire, le mutant lin-4

¹ Dans la suite de ce document, les microARN seront notés miARN. Un microARN particulier sera dénoté selon la numérotation définie dans la base de référence mirbase (miR-1, miR-7, lin-4, let-7,...). Les 2 fragments générés lors de la maturation des précurseurs étant intitulés miR-X-5p et miR-X-3p.

mime le gain de fonction de lin-14 et l'expression de la protéine LIN-14 persiste indiquant un contrôle de lin-14 par lin-4 (Arasu et al., 1991; Chalfie et al., 1981). De manière intéressante, les mutations entraînant un gain de fonction de lin-14 correspondent à des mutations dans la région 3'-UTR qui est capable de s'hybrider avec lin-4 (Wightman et al., 1993) (Yeh, 1991). En 1993, l'équipe d'Ambros montre que le gène lin-4 code 2 petits ARN, un de 22 nucléotides et un de 61 nucléotides ne contenant aucune phase ouverte de lecture (Lee et al., 1993). De plus, Lee et collègues ont montré que le 3'-UTR de lin-14 possède une complémentarité partielle avec la séquence de lin-4 : ils ont alors émis l'hypothèse que lin-4 était responsable de l'inhibition de lin-14 à la fin du stade L1 (Lee et al., 1993).

En 2000, let-7 est le deuxième miARN découvert chez *C. elegans* par l'équipe de Ruvkun (Reinhart et al., 2000). Contrairement à lin-4, partiellement homologue à miR-125, la forme mature de let-7 est parfaitement conservée dans d'autres organismes, tant chez la drosophile (Caygill and Johnston, 2008) que chez les vertébrés (Rodriguez et al., 2004). Depuis cette découverte, environ 24 000 publications scientifiques ont été publiées, mettant en évidence la présence de miARN dans différents organismes ainsi que leur rôle dans de nombreux processus biologiques tels que la régulation de l'embryogenèse, la différenciation, le cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence... La dernière version de miRbase, la base données regroupant toutes les séquences connues de miARN (version 20, juin 2013 ; www.mirbase.org), recense chez l'Homme 2578 miARN différents, pour un total de 24521 entrées.

B. Biogenèse des miARN

1) Transcription des pri-miR

Chez l'Homme les miARN sont répartis sur l'ensemble des chromosomes à l'exception du chromosome Y. A partir de leur localisation génomique, les miARN sont répartis en trois grands groupes (cf. figure 25) :

Les miARN intergéniques : ces miARN sont situés sur des régions distinctes des unités transcriptionnelles connues. Elles possèdent ainsi leur propre promoteur et éléments régulateurs et sont transcrits par l'ARN polymérase de type II. Chaque transcrit primaire, long de 3 à 4kb, possède un signal de polyadénylation. Il peut contenir un ou plusieurs miARN.

Les miARN introniques : ils sont retrouvés dans les introns de gènes connus. De la même manière que les précédents, ils peuvent s'organiser seul ou en cluster et leur expression peut être dépendante de la transcription de leur gène hôte. Un cas particulier correspond aux « mirtrons », qui ont la particularité d'être « maturés » dans le noyau par la machinerie d'épissage lorsque le précurseur du

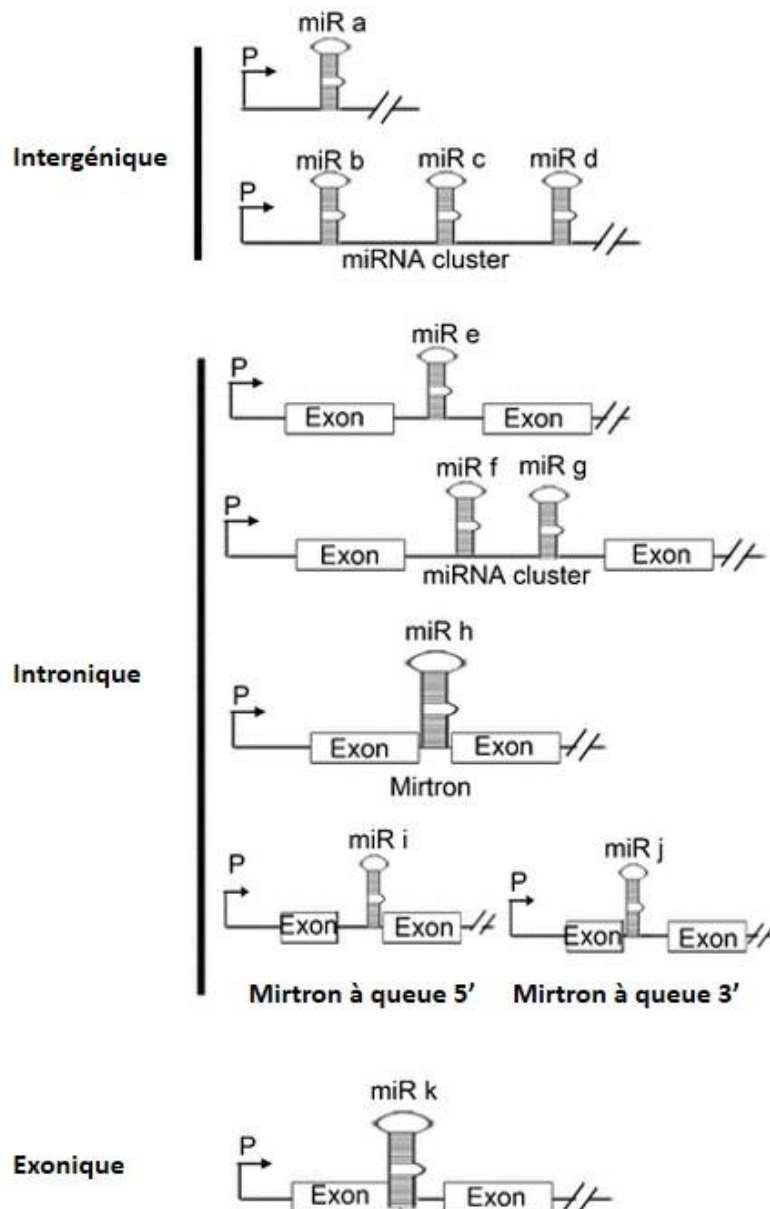


Figure 25: Organisation génomique des microARN (d'après Hussain 2012)

Représentation des différents modes d'expression des microARN. Les microARN intergéniques sont contrôlés par leur propre promoteur aussi bien comme un simple gène (miR-a) ou en cluster (miR-b à miR-d). Les microARN peuvent être retrouvés dans l'intron d'un gène codant pour une protéine et seront alors sous le contrôle du promoteur de ce gène. Ils peuvent se présenter comme un microARN intronique simple (miR-e) ou en forme de cluster intronique (miR-f et miR-g). Dans certains cas, le microARN intronique peut constituer l'ensemble de pri-miR, on parle alors de mirtron (miR-h). Alors le processing par le microprocesseur n'est pas requis. Les mirtrons qui possèdent une extension de séquence en 5' sont les mirtrons à queue 5' (miR-i) ou une extension en 3' et sont alors appelés les mirtrons à queue 3' (miR-j). Les microARNs exoniques (miR-k) sont eux plus rares.

miARN correspond à l'intron du gène hôte. En dépit d'une localisation génomique « intronique », certaines de ces séquences peuvent disposer d'un promoteur autonome. Mais dans la majorité des cas, on observe une bonne corrélation entre les niveaux d'expression des miARN et des transcrits codés par les gènes hôtes.

Les miARN exoniques : ce sont des miARN rares qui souvent chevauchent un exon et un intron. Récemment, miR-198 un miARN situé dans la partie 3'-UTR du gène codant pour la follistatin-like 1 (FSTL1) a été montré régulé en compétition avec l'expression de son gène hôte. KH-type splicing regulatory protein (KSRP), constitue ici le switch permettant l'expression de miR-198 et donc directement la répression de la follistatin-like-1 lors de la réépithélisation (ou inversement) par la génération de transcrits alternatifs (Sundaram et al., 2013).

2) Clivage du pri-miR en pre-miR et export au noyau.

Les miARN dits « canoniques » correspondent aux miARN qui après leur transcription forment un long précurseur dénommé pri-miR. Ce pri-miR est clivé par le complexe microprocesseur au niveau nucléaire composé principalement par Drosha et son partenaire DGCR8 aboutissant à la formation d'un court précurseur dénommé pré-miR qui sera exporté au cytoplasme.

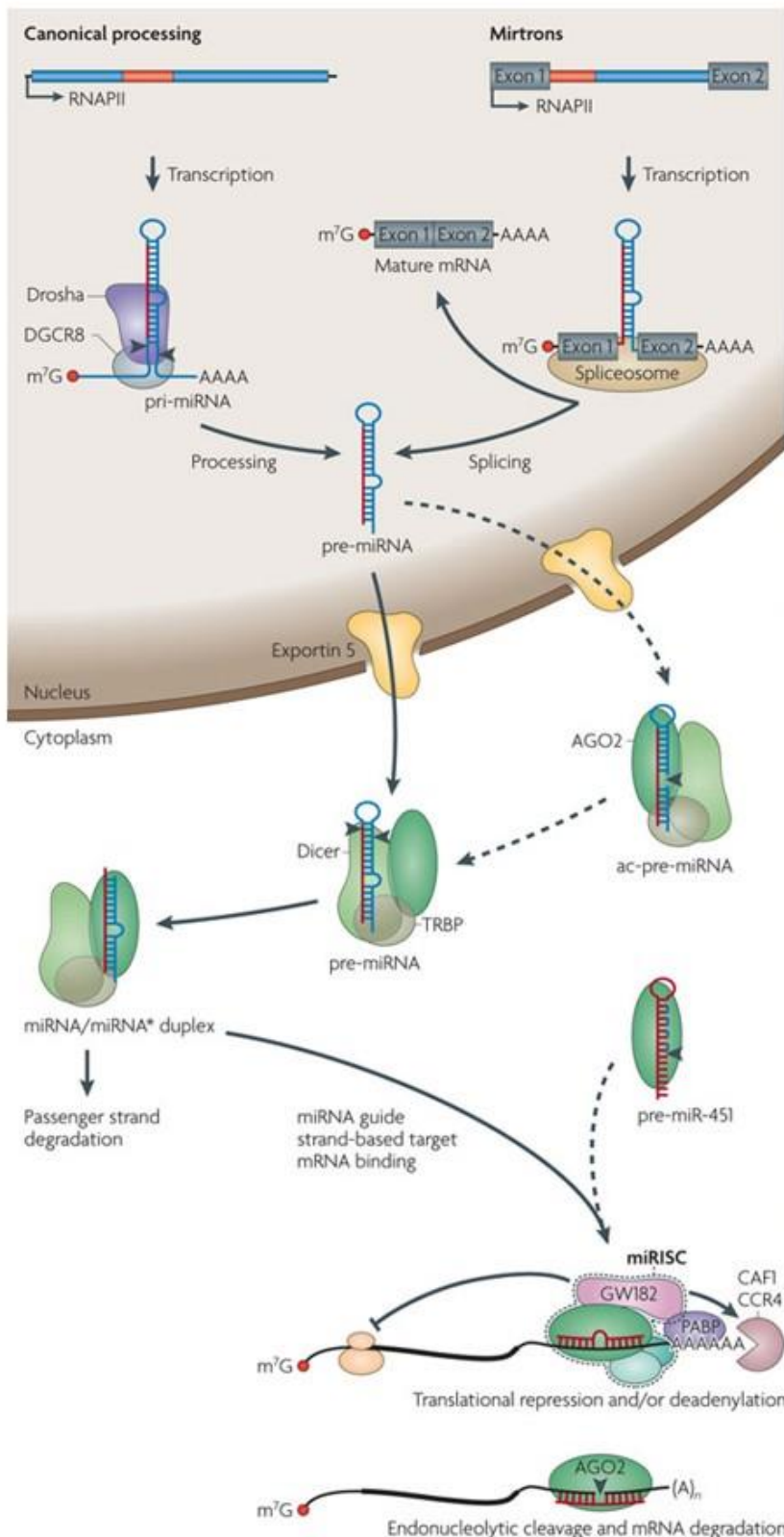
Le pri-miARN est reconnu, par l'intermédiaire de DGCR8, une RNA-BP (RNA binding protein), qui interagit directement avec la jonction entre le double brin et les parties simple brin de l'épingle à cheveux. L'association de DGCR8 avec Drosha permet un clivage du double brin à 11 paires de bases de cette jonction simple/double brin (Han et al., 2006). Drosha est une ribonucléase type RNase III qui clive le double brin et laisse un décalage en 3' de 2 nucléotides, une marque laissée par les RNase III.

Par ailleurs, il a été montré que ce complexe microprocesseur peut être actif sous différentes formes : une forme simple composé de Drosha et de DGCR8 est *in vitro* nécessaire et suffisant pour induire le clivage du pri-miARN en pre-miARN (Gregory et al., 2004). Ce complexe existe aussi associés à d'autres protéines partenaires (Helicases, RNA binding proteins...) qui peuvent réguler son activité catalytique. Des résultats de HITS-CLIP indiquent que ce complexe Drosha/DGCR8 peut induire le clivage d'autres types d'ARN (Macias et al., 2012) (cf. figure 26).

3) Transport du pre-miR jusqu'au cytoplasme

Le décalage en 3' de 2 nucléotides est important pour la reconnaissance par l'exportine 5 (Yi et al., 2003) : l'exportine-5 distingue un décalage en 3' (3'-overhang) d'un décalage en 5' (5'-overhang) (Zeng and Cullen, 2004). L'encombrement allostérique trop important lors de l'association avec

Figure 26: Biogenèse des microARN
(d'après Krol et al., 2010).



Un miRNA est généralement transcrit à partir d'un seul locus transcriptionnel, mais certaines séquences peuvent être présentes sous la forme de plusieurs copies, localisées sur des loci différents. Les loci des miRNA sont situés dans des introns de gènes codants (gènes produisant une protéine fonctionnelle), dans des zones intergéniques (correspondant a priori à des unités transcriptionnelles autonomes, voire même, de façon exceptionnelle, dans des exons de gènes codants). La production des transcrits initiaux (pri-miRNA) est généralement opérée par une ARN polymérase de type 2. Les pri-miRNA, de longueur variable (de quelques centaines de base jusqu'à plusieurs dizaines de kilobases) sont nucléaires. Les pri-miRNA contiennent une ou plusieurs structures particulières en tige-boucle, qui sont clivées du reste du pri-miRNA par une RNase double-brin nucléaire nommée Drosha (Lee et al., 2003). La coupure est réalisée à la base de la tige double-brin. La libération du ou des pre-miRNA, de longueur 70-100 nucléotides, permet leur export du noyau vers le cytoplasme par le transporteur « exportin-5 » (Yi et al., 2003). Une fois dans le cytoplasme, la digestion des tiges-boucles par Dicer, une autre RNase de type 3, produit des duplex de petits ARN d'une longueur de 21 à 22 nucléotides. Ceux-ci sont incorporés dans un complexe enzymatique immature de type RISC qui, lors de sa maturation, élimine un des deux brins du duplex pour ne conserver que le microARN fonctionnel (Filipowicz, 2005). En général, on retrouve dans la cellule des quantités significatives que pour un seul des 2 brins.

l'exportine a été révélé par la résolution cristallographique de l'exportine-5 (Okada et al., 2009). En plus de ce rôle de transport il est observé qu'une diminution de l'association miARN/exportine-5 empêche la dégradation nucléaire du pré-miARN (Zeng and Cullen, 2004).

Une fois associé à l'exportine 5, le transport du pré-miARN du noyau au cytoplasme est effectué après formation d'un complexe avec la forme active de la GTPase Ran, liée au GTP (Yi et al., 2003). Le complexe pré-miARN /Exportine 5/Ran-GTP est ensuite transloqué du noyau vers le cytoplasme à travers les pores nucléaires (Yi et al., 2003). Une fois dans le cytoplasme RanBP1 et/ou RanBP2, des protéines localisées spécifiquement dans le cytoplasme, hydrolyse le GTP en GDP de la GTPase Ran, induisant un changement conformationnel de Ran et ainsi la dissociation du complexe et la libération du pré-miARN dans le cytoplasme.

4) Maturation du pré-miR en miR mature

Dans le cytoplasme, la RNase III Dicer reconnaît le pré-miARN et joue un double rôle : (i) le domaine RNase III clive le pré-miARN en un double brin d'ARN de 21 à 23 nt (Bernstein et al., 2001). Chaque brin est nommé en fonction de sa position sur le pré-miARN : « -3p » (venant du bras 3') et « -5p » (venant du bras 5'). Le complexe ARNdb/Dicer formé, induit le recrutement de la machinerie miARN appelé RISC. La machinerie RISC est constituée par la protéine Argonaute 2 (Ago2) chez l'Homme. La résolution des structures cristallographiques des protéines argonautes, notamment chez les procaryotes, ont permis au cours des dernières années de mieux en comprendre leur fonction. Les protéines Ago sont bilobées et composées de 4 domaines globulaires (domaine N, PAZ, MID et PIWI). La partie 5' du miARN interagit avec le domaine MID, alors que la partie 3' du miARN interagit avec le domaine PAZ d'Ago2. Plus récemment la résolution cristallographique d'Ago2 associée avec miR-20a a permis de montrer que ce dernier interagissait avec les 4 domaines d'Ago2. De plus, l'association d'Ago2 avec un miARN permet la stabilisation d'Ago2 avec une moindre sensibilité à la digestion par des protéases, indiquant une forte stabilité du complexe Ago2/miARN (Elkayam et al., 2012).

Le complexe RISC est associé aux protéines TRBP et GW182. TRBP a été montré comme interagissant directement avec Dicer et possède aussi la capacité d'induire le recrutement des protéines Ago de manière à former le complexe RISC (Chendrimada et al., 2005). Plus récemment, la résolution cristallographique du RLC (RISC Loading Complex) montre que TRBP interagit avec la région N-ter de Dicer, et la partie C-ter d'Ago2, suggérant bien un lien fonctionnel entre Dicer et Ago2 (Wang et al., 2009a). Chez la drosophile, l'association GW182 au complexe RISC (via des domaines de liaison aux protéines Ago) a été montrée comme nécessaire pour l'action des miARN lors de la répression traductionnelle sur une cible par dégradation de la queue polyA ou pour le recrutement des ARNm

cible au niveau des P-bodies, des structures cellulaires rendant inaccessible l'ARNm à la traduction (Chekulaeva et al., 2010). Chez l'Homme, TNRC6A, TNRC6B et TNRC6C sont des paralogues de GW182 et semblent avoir des rôles relativement similaires. Cependant, chez l'Homme, ces paralogues de GW182 associés avec PABPC1 seul (une protéine de liaison à la queue poly A) n'induit pas la dégradation de la queue polyA de l'ARNm, suggérant l'intervention de protéines partenaires (Chekulaeva et al., 2011).

C. Les miARN et la répression traductionnelle

1) Mécanismes de répression des cibles

Les miARN agissent principalement par inhibition de l'expression de gènes spécifiques à un niveau post-transcriptionnel. Leur fonction régulatrice s'opère après hybridation avec la séquence du gène cible, qui permet de guider la protéine Argonaute et les autres protéines du complexe RISC au contact de l'ARNm cible. Initialement, une distinction nette avait été établie entre le mode de régulation chez les plantes et chez les animaux. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, les miARN sont souvent homologues avec leur cible sur toute la séquence : ils fonctionnent de ce fait de la même façon que des siARN, par clivage de l'ARNm cible par la protéine Argonaute. Par contre chez les animaux, les miARN ne présentent qu'une homologie partielle avec les ARNm cibles. Le mode d'inhibition diffère alors de celui des siARN car il ne résulte pas forcément du clivage de l'ARNm cible mais plutôt d'une inhibition de la traduction (Bartel, 2004; He and Hannon, 2004). Si le mécanisme exact d'inhibition de la traduction reste encore débattu, 2 protéines semblent y jouer un rôle essentiel : une protéine de la famille Argonaute et la protéine GW182 (Eulalio et al., 2008). L'interaction de ces protéines via des domaines riches en répétitions glycine/tryptophane contenus dans la protéine GW182 est essentiel pour la fonction inhibitrice des miARN (El-Shami et al., 2007). A noter que l'inhibition de la traduction par un miARN conduit à l'augmentation du turn-over des ARNm régulés et au final, à une moindre concentration de cet ARNm dans la cellule (Huntzinger and Izaurralde, 2011). La distinction entre le mode de régulation par les miARN chez les plantes et chez les animaux n'est pas nécessairement aussi tranchée car certains miARN végétaux peuvent également inhiber leurs cibles par inhibition de la traduction (Brodersen et al., 2008; Lanet et al., 2009). Le mécanisme de reconnaissance des cibles dans de telles situations ou chez les animaux, est encore mal appréhendé. La zone d'homologie nécessaire au miARN pour réguler l'expression d'un ARNm chez les animaux se limite habituellement aux 6 nucléotides de la « seed séquence », situés entre les nucléotides 2 et 7 du miARN (Lewis et al., 2005). Cette séquence cible en général la partie 3' non traduite de l'ARNm mais là-encore, des exceptions ont été rapportés et l'inhibition peut être provoquée par une interaction au niveau de la séquence codante (Duursma et al., 2008). En raison de la faible taille du seed (6 nucléotides), un seul miARN (s'il est

suffisamment exprimé !...) peut théoriquement réguler plusieurs milliers de gènes au sein d'un génome. Inversement, un seul ARNm peut en principe être régulé par de nombreux miARN. De nombreux paramètres influencent l'occurrence d'une interaction entre un miARN et son ARNm cible, faisant de la prédiction bioinformatique une tâche assez peu exacte. A noter que certains paramètres, comme l'exigence d'une conservation entre espèces (Friedman et al., 2009), peuvent permettre d'améliorer la qualité des prédictions. A la réserve près, toutefois, que la conservation d'un ciblage par un miARN particulier soit effective : tous les mécanismes ne sont pas nécessairement conservés chez toutes les espèces, et des mécanismes différents de contrôle de l'expression génique peuvent opérer dans différentes espèces. En dépit de tels raffinements, les algorithmes de prédiction sont encore peu précis et génèrent un nombre important de «faux-positifs». En général, l'intégration de telles prédictions avec des données expérimentales indépendantes permet de mieux préciser quelles sont les cibles les plus pertinentes dans un contexte biologique spécifique (cf. revue (Bertero et al., 2013b)).

La traduction des ARNm est initiée par le recrutement d'un complexe d'initiation de la traduction (eIF : eukaryotic translation initiation factor) sur la coiffe 5' de l'ARNm qui permet le recrutement des sous unités ribosomales 40S. Ce complexe est composé de plusieurs sous-unités, eIF4E,-F,-G, et jouant chacun différents rôles pour l'initiation de la traduction que je ne détaillerai pas ici. Un mécanisme connu pour stimuler l'initiation de la traduction et faciliter le recyclage des ribosomes, est la circularisation de l'ARNm grâce à l'interaction du complexe eIF avec PABP1, situé sur la queue polyA de l'ARNm. Le recrutement de l'unité ribosomale 60S initie le début de la phase d'élongation.

Les miARN induisent une répression post-transcriptionnelle soit en bloquant certaines étapes de l'initiation de la traduction ou soit en déstabilisant l'ARNm. Dans tous les cas on observe une diminution de la quantité de protéines issues du transcrit ciblé par le miARN. Ici, j'énoncerai brièvement les différents mécanismes connus sans en détailler l'aspect moléculaire faisant l'objet de nombreuses revues (voir (Filipowicz et al., 2008)).

Deux grands types de mécanismes aboutissent à l'action du miARN :

Blocage de la phase d'initiation : l'analyse de gradients de polysome sur une cible de let-7 a permis de montrer qu'un miARN peut induire un blocage du recrutement des sous-unités ribosomiques sur un ARNm cible (Pillai et al., 2005). Le complexe RISC associé au miARN induit soit un blocage de la reconnaissance de la coiffe 5' de l'ARNm cible par compétition avec le complexe eIF comme suggéré par Kiriakidou et collègues (Kiriakidou et al., 2007), soit par le blocage du recrutement de la grande sous-unité ribosomale 60S (Chendrimada et al., 2007).

Blocage par déstabilisation de l'ARNm : chez les eucaryotes, la dégradation des ARNm est initiée par un raccourcissement graduel de sa queue poly A. Sa localisation au niveau de granules cytoplasmiques, les « P-bodies » initient sa dégradation par des exonucléases agissant par digestion du 5' au 3' ou du 3' au 5' lorsque l'ARNm est déadénylé. Il a été montré que Ago2 interagit directement avec GW182, un composant des P-bodies, de manière à induire la déadénylation des ARNm cibles (Chen et al., 2009).

Un autre mécanisme a été décrit récemment par Meijer et collègues, qui ont montré que dans des HeLa, la dégradation de l'ARNm du système est une conséquence d'inhibition de la traduction par l'intermédiaire du facteur eIF4A2 (Meijer et al., 2013).

Si les mécanismes mis en jeu commencent ainsi à être mieux connus, de nombreuses interrogations demeurent : quelle est l'importance relative de chacun de ces mécanismes ? Agissent-ils en synergie pour obtenir une meilleure efficacité de répression ? Est-ce que les mécanismes mis en jeu dépendent de la cible et/ou du type tissulaire ou cellulaire dans lequel il intervient ? Des études cinétiques plus précises, prenant notamment en compte la dégradation de l'ARNm cible ainsi que la dégradation de la protéine cible, doivent permettre de répondre à ces interrogations. Récemment, Bazzini et collègues ont ainsi étudié chez le poisson zèbre la cinétique de ces mécanismes grâce à des expériences prenant en compte à la fois la présence des ribosomes sur les ARNm cibles de miR-430 ainsi que la déadénylation de ces même ARNm (Bazzini et al., 2012). Ils postulent que dans ce contexte, le miARN induit dans un premier temps un blocage de l'initiation de la traduction puis une déstabilisation de l'ARNm cible (Bazzini et al., 2012). En revanche, aucune étude équivalente n'a été menée jusqu'à présent chez l'Homme.

2) La reconnaissance des cibles et la notion de « seed »

La notion de « seed » constitue la principale règle d'appariement qui a été utilisée dans le développement de nombreux outils de prédiction de cibles. Cependant, en tenant compte uniquement de la seule région « seed », les prédictions bioinformatiques renvoient des listes de plusieurs centaines de cibles contenant de nombreux « faux positifs ». Ainsi, rapidement, d'autres paramètres affectant le nombre de cibles prédites, comme la conservation du 3'-UTR de l'ARNm entre espèces ont été intégrés à ces analyses.

Les miARN sont apparus précocement au cours de l'évolution, comme en atteste la conservation de certaines familles (Berezikov, 2011; Hertel et al., 2006). Entre l'apparition de miARN au niveau de l'embranchement des bilatériens et des vertébrés, et l'émergence d'autres familles chez les mammifères placentaires, il est tentant d'associer l'apparition de certains miARN à l'apparition de caractères importants de spéciation (Berezikov, 2011). D'un point de vue fonctionnel, la seule

conservation de la séquence des miARN est insuffisante, et doit aller de pair avec la conservation de ses cibles. Davantage de données expérimentales seront nécessaires pour permettre de mieux définir l'importance de ce type de régulation. Il s'agira en fait de tester les deux hypothèses établies à ce jour : selon la première, une grande partie des 3'-UTR de cibles seraient conservées au cours de l'évolution car soumises à une pression sélective pour maintenir sa séquence de reconnaissance par le miARN (Friedman et al., 2009); selon la seconde hypothèse, les cibles évolueraient de manière rapide (Tang et al., 2010). Ainsi, il est à noter que les prédictions incluant la conservation des cibles et qui sont utilisées dans la majorité des cas, peuvent engendrer la perte de sensibilité vis-à-vis de cibles non conservées au cours de l'évolution.

La notion de « seed » communément admise a été initialement introduite par Bartel (Lewis et al., 2003), sur la base d'une prédiction bio-informatique s'appuyant sur la conservation des sites au cours de l'évolution. Mais la validation expérimentale de certaines cibles ne respectant que partiellement la règle du « seed » montre de nombreuses exceptions à cette règle. L'exemple le plus connu reste l'exemple des tous premiers miARN caractérisés: lin-4 et let-7 qui ciblent lin-41 et lin-14 alors que la règle du « seed » n'est que partiellement respectée (Arasu et al., 1991; Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). D'un point de vue expérimental, il est estimé que la recherche par le « seed » donne environ 30% de faux positifs. Il est probable que des paramètres encore non clairement identifiés expliqueront mieux à l'avenir pourquoi un ARNm est effectivement ciblé par un miARN. Il est ainsi indispensable de développer de nouvelles approches « sans a priori » pour identifier des cibles des miARN. Au cours des dernières années, de nombreuses techniques ont été développées et ont permis d'améliorer la compréhension du mode de fonctionnement complexe des miARN.

3) *Approches expérimentales pour l'identification des cibles*

Une des approches les plus utilisées combine les prédictions bioinformatiques à une analyse transcriptomique. Elle a pour avantage d'être simple à mettre en place et consiste dans un type cellulaire d'intérêt à moduler l'expression d'un miARN en l'inhibant ou au contraire en le surexprimant. L'analyse transcriptomique à l'aide d'outils de type biopuces (microarray), permet d'observer de manière globale les variations induites par cette modulation du miARN, en se basant sur le principe qu'un miARN induit *in fine* la dégradation de la cible et donc une diminution des niveaux d'expression de son transcrit. Les outils de prédiction de cibles permettent d'identifier ainsi parmi les transcrits les cibles potentielles d'un miARN. L'inconvénient de cette approche est l'observation des cibles directes ainsi que des gènes régulés de manière indirecte, ce qui aboutit de facto à une augmentation du nombre de cibles potentielles. L'action d'un miARN sur une cible peut n'induire aucune variation au niveau du transcrit mais en revanche affecter le niveau de la protéine, comme c'est le cas avec lin-4

qui cible lin-14 (Lee et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Wightman et al., 1993). Ainsi pour pallier ce biais, des approches protéomiques de type SILAC ont vu le jour (Vinther et al., 2006). Ces approches permettent à travers le marquage total des protéines exprimées dans des cellules ou des tissus avec des isotopes la détermination des variations des niveaux de protéines en utilisant une identification par spectrométrie de masse. Comme précédemment, les outils bioinformatiques de prédictions de cibles permettent l'identification des cibles potentielles parmi les protéines régulées. Dans ces deux approches, l'utilisation d'outils de prédiction de cibles permet une meilleure identification des cibles. De plus dans ces travaux, un fort enrichissement en sites prédictifs du miRNA étudiés sont observés dans le 3'UTR des gènes/protéines régulé(e)s confortant ces approches (Selbach et al., 2008). Cependant, certaines cibles échappent à ce processus de sélection. A noter enfin que les conditions de surexpression d'un miARN exogène à des niveaux supra-physiologiques *in vitro* peuvent introduire des biais supplémentaire induisant des régulations qui ne seraient pas observées dans des conditions physiologiques. Incidemment, l'utilisation des techniques de séquençage à très haut-débit rend possible d'évaluer l'impact des miARN sur la traduction par l'utilisation des profils ribosomiques (Bazzini et al., 2012; Guo et al., 2010). La digestion par une RNase permet la digestion des ARNm non fixés par des ribosomes et donc non traduits, alors que les ARNm traduits sont protégés de cette dégradation par la présence des ribosomes. La combinaison de cette approche avec du séquençage des mêmes ARNm, a permis de montrer que dans le cas de surexpression d'un miARN, la diminution traductionnelle observée est due dans plus de 80% des cas à une diminution de l'ARNm (Guo et al., 2010).

Les approches de HIT-CLIP (High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation) et de PAR-CLIP (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation), étudient ce problème de détection de cibles en effectuant des immuno-précipitations de la machinerie RISC (Chi et al., 2009; Hafner et al., 2010). Le séquençage des ARN immuno-précipités permet d'identifier les sites de fixation des miARN et de déterminer *in vivo* les interactions miARN-ARNm. De manière inattendue, la partie 3'-UTR représente environ le tiers des sites de fixation des miARN alors que le reste des séquences immuno-précipitées correspond à d'autres types de séquences, notamment une large partie correspond à des séquences codantes (CDS) ainsi que des introns (cf. figure 27)(Chi et al., 2009). Parmi les séquences correspondantes à des 3'-UTR, les sites de fixation d'Ago sont fortement enrichis au niveau du codon stop ou de la queue polyA (cf. figure 27), mettant en avant la localisation préférentielle des sites de miARN à des régions définies sur le 3'-UTR des cibles, comme déjà souligné dans d'autres études (Grimson et al., 2007; Le Brigand et al., 2010).

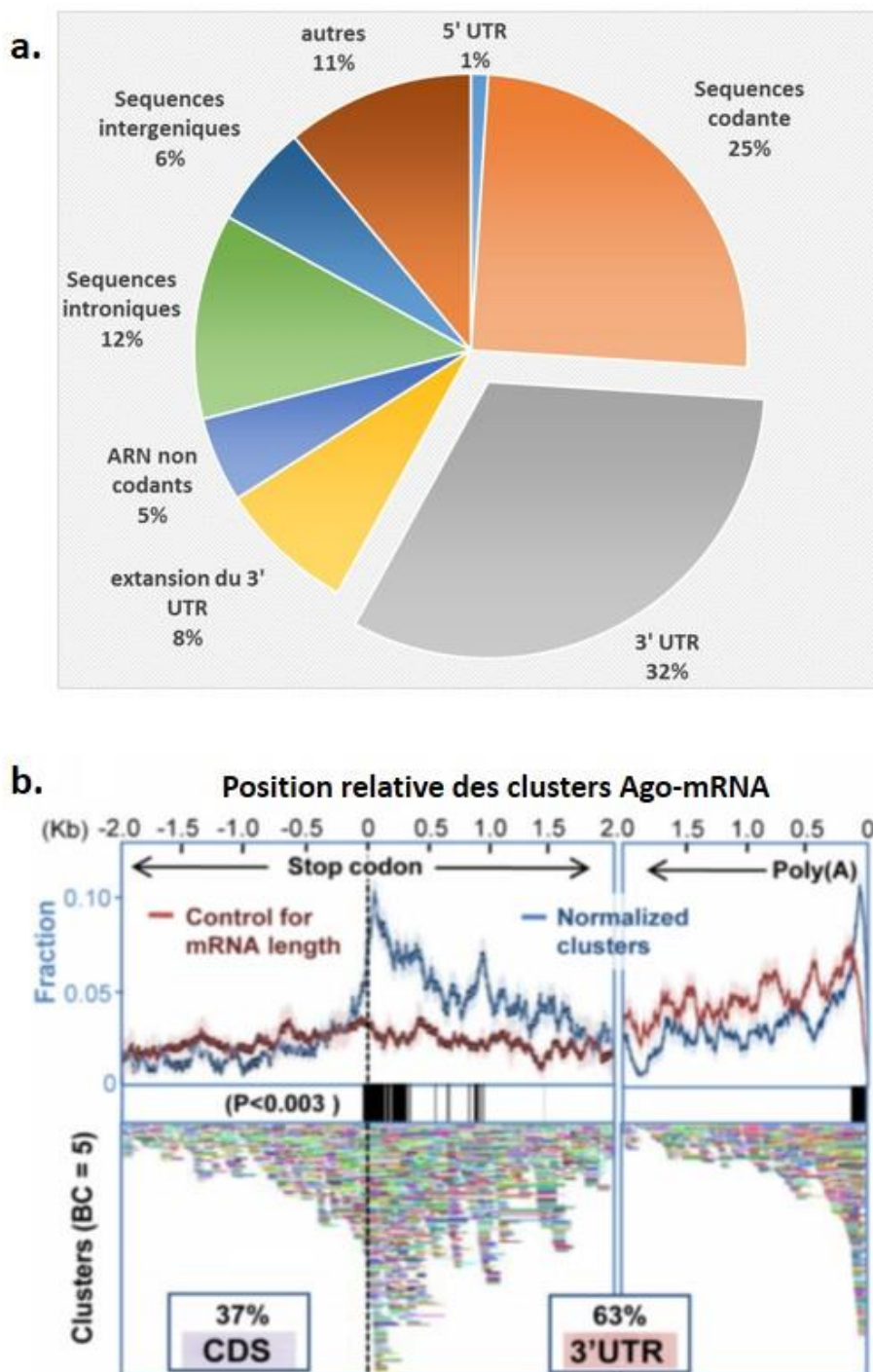


Figure 27: Données HITS-CLIP, une vue globale des sites de fixation des microARN (adapté de Chi et al., 2009)

a. Représentation en camembert de la proportion des types de séquences associées à la protéine Ago. On retrouve une association forte avec les 3'UTR mais aussi avec des séquences codantes.

b. La figure indique le positionnement sur les 3'UTR des séquences associées aux régions 3'UTR correspondant au codon STOP et à la queue polyA.

D. MiARN et physiopathologie respiratoire.

1) *Implication dans la morphologie pulmonaire*

Chez la souris, l'invalidation spécifique de DICER dans l'épithélium pulmonaire affecte la ramification et la structure du tractus respiratoire suggérant un rôle clé des miARN dans la morphogenèse pulmonaire (Harris et al., 2006). En outre, Dicer et les protéines Ago sont fortement exprimées dans les parties distales des poumons embryonnaires (Lu et al., 2005). De plus, des modifications des profils d'expression des miARN sont observées au cours du développement pulmonaire (Bhaskaran et al., 2009). D'autres travaux indiquent que le cluster miR-17-92 est réprimé au cours du développement pulmonaire et est impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales et dans le blocage de leur différenciation (Lu et al., 2007). Enfin, les miR-127 et miR-351 sont exprimés de façon transitoire lors de la formation des alvéoles pulmonaires (Bhaskaran et al., 2009).

2) *Dérégulation des miARN dans les pathologies respiratoires*

Aucune variation des miARN n'est observée au cours du vieillissement chez les souris adulte (Williams et al., 2007), en revanche plusieurs miARN (let-7, miR-221 et le cluster 17-92) sont fortement régulés dans les cancers pulmonaires en réponse à l'hypoxie induite par les tumeurs (Grosso et al., 2013; Hayashita et al., 2005; Navarro et al., 2009; Puissegur et al., 2011). Chez la souris, certains miARN comme miR-155 ou miR-199-5p sont régulés à la suite de fibroses pulmonaires induites à la bléomycine par des mécanismes associés à la voie du TGF (Pottier et al., 2009), 404].

Dans certaines pathologies respiratoires humaines (asthme, BPCO ou mucoviscidose ; cf. tableau 2) certains miARN ont été associés à la réponse inflammatoire qui est exacerbée dans contexte (pour revue voir (Giovannini-Chami et al., 2012)). Dans l'épithélium respiratoire des patients asthmatiques, il est reporté des variations des miARN comme la famille miR-34/449 qui est réprimé par l'effet de l'IL-13 (Solberg et al., 2012). Chez les patients CF d'élégants travaux montrent une surexpression de miR-138 dont la cible SIN3A est impliquée dans l'adressage du CFTR à la membrane des cellules épithéliales. Le blocage de miR-138 ou de son interaction avec sa cible SIN3A augmente l'adressage de CFTR à la membrane (Ramachandran et al., 2012).

E. La famille miR-449

Au cours de mon travail de thèse, nous avons démontré que les miARN de la famille miR-449 étaient les plus fortement régulés au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire et qu'ils étaient exprimés spécifiquement dans les cellules multiciliées (cf. partie Résultats Article 1). La famille miR-449, avait été reliée uniquement aux cancers dont la régulation dépendait de la voie E2F1. Plusieurs cibles avaient alors été décrites, qui reliaient l'expression de miR-449 à l'arrêt du cycle

Asthme		COPD		Mucoviscidose	
surexprimé	Réprimé	surexprimé	réprimé	surexprimé	réprimé
miR-126	let-7	miR-223	miR-923	miR-155	miR-126
miR-145a	miR-20b	miR-1274	miR-937	miR-101	miR-138
miR-146a	miR-133a	miR-101	miR-125-1b	miR-494	
miR-146b	miR-449	miR-144	miR-146a	miR-145	
miR-181	miR-106b	miR-146		miR-223	
miR-21	miR-19b	miR-452		miR-494	
miR-221	miR-27b	miR-119a			
miR-222	miR-200a				
miR-106	miR-27a				
miR-155	miR-34a				
miR-1246	miR-29c				
miR-663a	miR-141				
miR-1275	miR-34b/c				
miR-1228					
miR-149					
miR-1915					
miR-1908					
miR-92b					
miR-485					

Tableau 2: Régulation des microARN dans les pathologies respiratoires

cellulaire et à l'apoptose (Bao et al., 2012; Bou Kheir et al., 2011; Feng and Yu, 2010; Jeon et al., 2012; Lize et al., 2010b; Noonan et al., 2009). Nos travaux ont établi miR-449 comme un régulateur clé de la multiciliogénèse capable de contrôler plusieurs voies de signalisation nécessaires à la mise en place d'un phénotype multicilié (cf. partie Résultats Article 1). Dans cette partie introductive, je n'aborderai que les fonctions de miR-449 décrites avant nos travaux. Sa similarité avec la famille miR-34 sera plus largement discutée dans la section Discussion.

1) Localisation chromosomique et expression chez l'Homme

MiR-449 est une famille de miARN organisée en cluster et composée de 3 membres : miR-449a, -b et -c. Chez l'Homme, miR-449 est localisé sur le chromosome 5, dans l'intron du gène codant pour CDC20B, dont la fonction est inconnue à ce jour. CDC20B est un homologue de CDC20 qui est un activateur du complexe APC (« Anaphase Promoting Complex ») lors de la mitose.

Au cours de l'évolution, la structure génomique de CDC20B et de miR-449 est conservée dans le génome des vertébrés leur suggérant une fonction biologique importante.

MiR-449a et miR-449b possèdent la même séquence « seed » alors miR-449c possède un nucléotide en plus sur sa partie 5', décalant ainsi sa séquence « seed ». La famille miR-449 possède le même « seed » que les miARN de la famille miR-34.

MiR-34 est un élément de réponse à p53 et est capable d'induire l'apoptose ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire dans de nombreuses lignées cellulaires. Il possède deux homologues, miR-34b et miR-34c retrouvés sur une autre région génomique mais issus du même pri-miARN. L'ensemble des trois membres forme la famille miR-34.

Les familles miR-449 et miR-34 possédant la même séquence « seed », on leur retrouve un grand nombre de cibles communes.

2) Expression chez l'Homme

La base de données « Bodymap » (cf. figure 28), se base sur des expériences de séquençage à haut-débit dans différents tissus humains, et indique une expression forte de miR-449a et de miR-449b dans la trachée, les poumons, les trompes de Fallope et dans une moindre mesure l'utérus.

Les données générées dans le laboratoire, en accord avec l'ensemble des données de la littérature, confirment cette expression tissu-spécifique : miR-449 est fortement induit au niveau pulmonaire au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire dans les cellules multiciliées et chez la souris son expression est forte au moment de la naissance, c'est à dire lors de la formation de l'épithélium

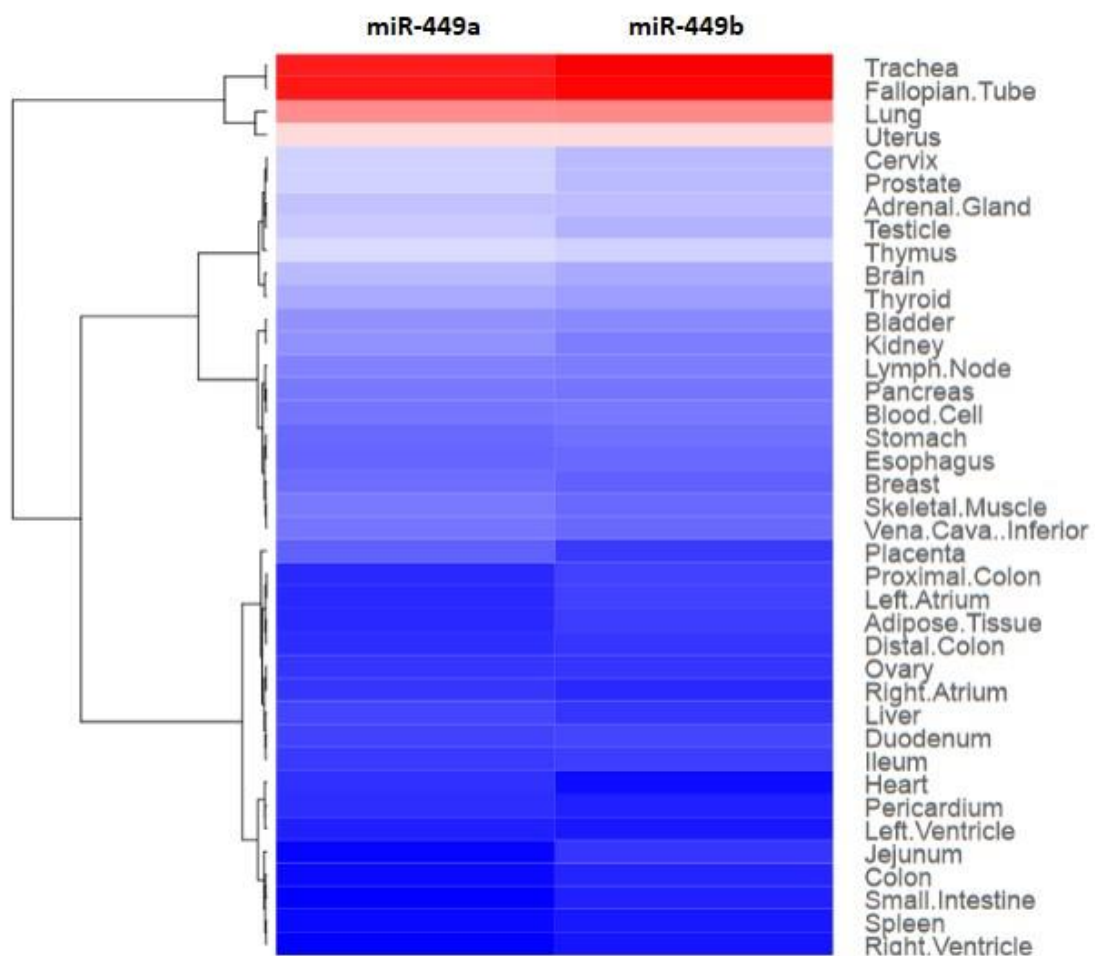


Figure 28: Expression des microARN miR-449a et miR-449 chez l'homme.

Représentation en Heatmap issue de la base de données www.mirnabodymap.org indiquant l'expression d'un microARN dans différents tissus humains. Les couleurs utilisées indiquent au sein d'un tissu l'expression relative d'un microARN à partir de données de puces à ADN. La couleur rouge indique une expression relative forte du microARN au sein d'un tissu alors que la couleur bleue une expression relative faible.

respiratoire (Lize et al., 2010a; Marcet et al., 2011b). Des hybridations *in situ* de miR-449a et miR-449c au cours de l'embryogenèse chez la souris, indiquent par ailleurs une expression avec un patron type « poivre et sel » dans le rhombencéphale (Hoesel et al., 2010).

Dans des contextes pathologiques, sont retrouvés surexprimé ou induit:

- miR-449b chez des patients atteints de cystites interstitielles (Sanchez Freire et al., 2010).
- miR-449 dans les carcinomes endométriaux (Chung et al., 2012; Wu et al., 2009).
- miR-449a est surexprimé dans le cas de dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales et cible WISP2, un acteur de la voie Wnt (Iliopoulos et al., 2009).
- Dans les muscles, miR-449 ainsi que d'autres miARN sont surexprimés chez les patients atteints de myopathies de Duchenne, ainsi que chez les souris modèles à la naissance et en réaction à des ischémies dans ce même modèle (Greco et al., 2009).
- miR-449 est induit au niveau pulmonaire à la suite d'infection par le virus de la grippe aviaire chez le poulet (Wang et al., 2009b), et lors d'instillation de nanoparticules chez la souris induisant un contexte inflammatoire (Halappanavar et al., 2011).

Dans certains cancers, l'expression de miR-449 est réprimée :

- miR-449a dans les cancers de la prostate, les auteurs montrent que miR-449a cible HDAC1, une histone deacétylase (Noonan et al., 2009). Ils proposent que dans ces cancers miR-449 joue un rôle de suppresseur de tumeurs.
- Dans les cancers pulmonaires, HDAC1 est surexprimé alors que miR-449 est réprimé de la même façon que dans les cancers de la prostate (Jeon et al., 2012).

3) Fonction de miR-449

L'expression de miR-449 serait donc dérégulée dans plusieurs contextes pathologiques, cependant les fonctions décrites par des analyses fonctionnelles invalidant miR-449 ont été effectuées dans deux contextes bien précis. D'une part, l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la senescence, et d'autre part, au cours de ma thèse, dans la formation des cils motiles.

Voie E2F1 et pRb : En réponse à des cassures de l'ADN, les facteurs de transcription p53 et E2F1 sont induits et activent l'expression de gènes pro-apoptotiques. Des mutations de p53 sont retrouvées dans pratiquement un tiers des cancers mettant en avant son rôle primordial comme suppresseur de tumeur (Hollstein et al., 1991). p53 active l'expression de miR-34a qui en retour induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Tarasov et al., 2007). Dans de nombreux cas de cancers, l'expression de miR-34a est fortement altérée et des modifications de la méthylation de son promoteur sont observées

(Lodygin et al., 2008). D'autre part E2F1 induit l'expression de miR-449 (Lize et al., 2010b). MiR-449 cible E2F1 formant ainsi une boucle de régulation négative (Bao et al., 2012; Lize et al., 2010b; Zauli et al., 2011). De manière commune, miR-449 et miR-34 cible des « pocket protein », qui sont responsable de la phosphorylation de pRb et donc l'avancée dans le cycle cellulaire. Aussi il a été montré récemment que miR-449 cible CDC25A, un régulateur important du cycle cellulaire contrôlant l'association de certaines « pocket protéines » (Bertero et al., 2013a). Ainsi via ces différentes cibles, miR-449 (de même que miR-34) contrôle l'arrêt du cycle cellulaire (Bao et al., 2012; Bou Kheir et al., 2011; Feng and Yu, 2010; Lize et al., 2010b). En plus de cette fonction, miR-449 induit l'apoptose, cependant ces mécanismes sont encore peu connus (Bou Kheir et al., 2011; Lize et al., 2010b).

MiR-449 et les cellules multiciliées : Au cours de ma thèse, comme nous le verrons en détail dans la partie Résultats, nous avons montré que miR-449 est fortement enrichi dans les cellules multiciliées au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire et de l'épiderme d'embryon de xénope. Son invalidation par différentes approches montre un blocage de la différenciation terminale des cellules progénitrices des cellules multiciliées via l'absence de blocage de la voie Notch. En effet, miR-449 cible le ligand Dll1 et son récepteur Notch1 (cf. partie III. 2. A). En plus de ces analyses fonctionnelles, chez les mammifères on retrouve miR-449a et miR-449b fortement exprimés dans tous les tissus possédant des cellules multiciliées (trachée, trompes de Fallope, poumons) (cf. figure 28) renforçant nos conclusions quant au rôle de miR-449 comme régulateur important de la multiciliogénèse.

2. Les voies de signalisation

Les mécanismes moléculaires permettant de diriger le destin cellulaire, la spécification et la différenciation d'une cellule en un type donné doté de fonctions particulières, sont régis par différents signaux extracellulaires qui vont être transduits à l'intérieur de la cellule en vue de déclencher un ensemble de programmes géniques spécifiques. Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la différenciation d'une cellule multiciliée sont nombreuses et leurs interconnexions complexes. Je décrirai ici les voies principales que j'ai plus étudiées : les voies Notch et BMP. Je parlerai ensuite des voies de signalisation des petites RhoGTPases et des PCP et de leurs rôles dans l'acquisition du phénotype multicilié. Un chapitre sera ensuite consacré aux interconnexions entre ces différentes voies et j'expliquerai en quoi les miARN peuvent être considérés non seulement comme des régulateurs importants de ces voies de signalisation mais bien comme de véritables chefs d'orchestre capables de contrôler finement ces interconnexions.

A. La voie Notch

1) Historique

La voie Notch (dérivé du mot anglais « entaille ») a été identifiée pour la première fois il y a un siècle par l'équipe de Morgan chez la drosophile, après l'observation d'un mutant portant des stries sur le bord de l'aile (Artavanis-Tsakonas and Muskavitch, 2010). Le récepteur Notch a, quant à lui, été cloné chez la drosophile par Artavanis-Tsakonas et collègues en 1983 chez la drosophile (Artavanis-Tsakonas et al., 1983). La drosophile est resté le modèle le plus utilisé pour étudier le rôle de la voie Notch lors du développement, et plus particulièrement dans celui des ailes (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Irvine and Vogt, 1997). L'étude phylogénique de plusieurs organismes modèles d'eucaryotes indique que la voie Notch est effective chez l'ensemble des métazoaires chez qui récepteurs et ligands sont identifiés. Plus tôt au cours de l'évolution certains éléments de la voie Notch sont prédits chez LECA (Gazave et al., 2009), mais en l'absence de ligands et de récepteurs, cela suggère un rôle de ces effecteurs différent de celui que l'on connaît dans la communication Notch intracellulaire. En revanche, l'apparition des ligands et récepteurs est notée chez tous les métazoaires, c'est-à-dire la classe regroupant tous les animaux pluricellulaires. La voie Notch joue un rôle important dans la différenciation des nombreux types cellulaires. Il est postulé que la voie Notch n'envoie pas de signaux directs pour la différenciation cellulaire, mais plutôt qu'elle donne la capacité aux cellules d'initier un programme de différenciation sous l'influence de signaux spécifiques au contexte tissulaire.

2) Mécanisme d'activation : l'activation en trans

L'activation de la voie Notch requiert la présence de 2 cellules : une cellule émettrice de signal et une cellule réceptrice de signal. La cellule émettrice possède un ligand à sa membrane, Delta ou Jagged/Serrate qui interagit avec le récepteur Notch situé sur la cellule réceptrice (cf. figure 29) (Fehon et al., 1990).

Le récepteur est traduit sous forme de précurseur, puis subit deux clivages protéolytiques. Après un premier clivage initié par la Furine dans l'appareil de Golgi (clivage S1), le récepteur se trouve sous forme d'un hétérodimère composé de la partie intracellulaire (NICD) et la partie extracellulaire (NECD) (Blaumueller et al., 1997). Le récepteur est ensuite exprimé à la surface cellulaire où il subit un deuxième clivage par le complexe TACE (Tumor Necrosis Factor Alpha-Converting Enzyme) (Brou et al., 2000). Au cours de ces deux clivages successifs le récepteur Notch est glycosylé (O-fucosylation et O-glycosylation) par plusieurs enzymes sur la partie de son domaine extracellulaire riche en répétition de domaines EGF (Bruckner et al., 2000; Moloney et al., 2000a; Moloney et al., 2000b). Ces glycosylations sont indispensables pour rendre le récepteur fonctionnel (Luther and Haltiwanger, 2009).

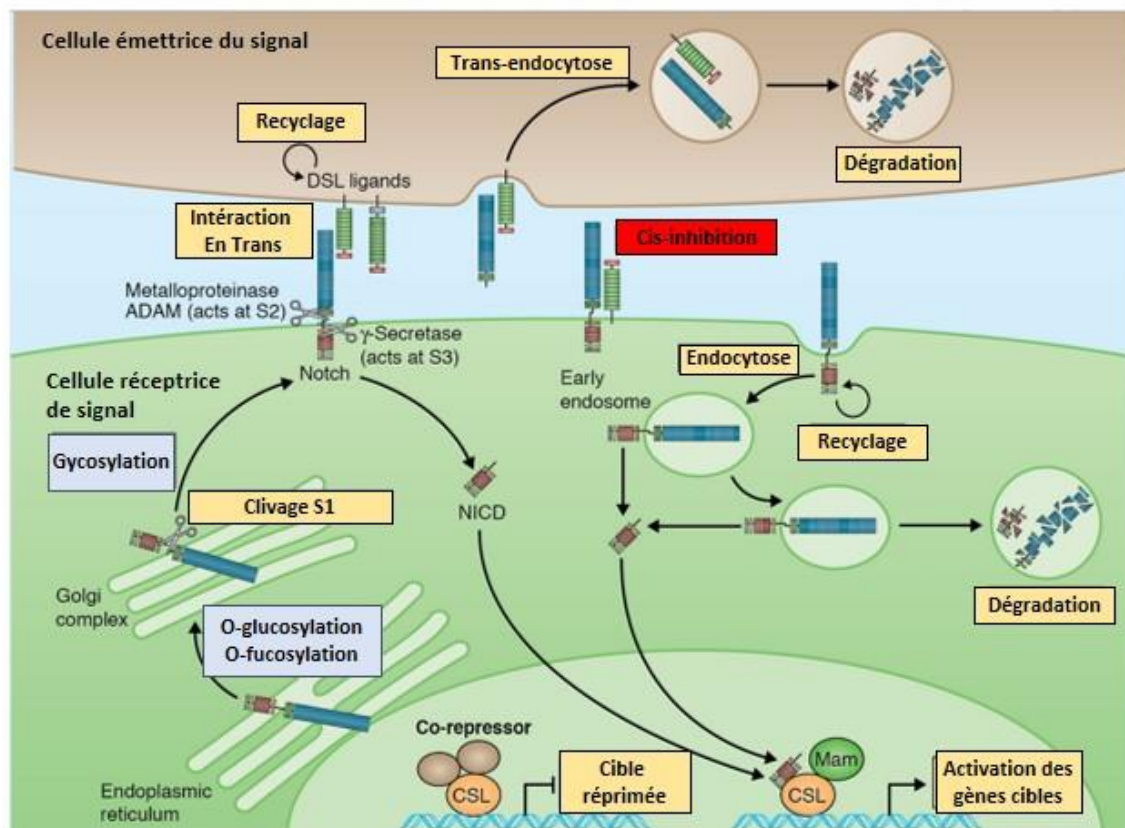


Figure 29: La voie de signalisation Notch (d'après Hori et al, 2013)

Avant d'être exprimé et d'être actif à la membrane, le récepteur Notch subit une succession de clivage (notés S1, S2 et S3) ainsi que de nombreuses modifications post-traductionnelles (fond bleu clair). La voie de signalisation Notch est une voie de communication. Ainsi une cellule dite émettrice (fond marron) envoie un signal via son ligand qui interagit avec le récepteur d'une cellule adjacent dite réceptrice (fond vert), ce mécanisme est appelé la trans-activation. Cette association provoque le clivage de la partie intracellulaire du récepteur (NICD) qui est relocalisé au noyau et à travers l'association avec des partenaires induit l'activation de gènes cible. Le complexe restant ligand-récepteur est dégradé dans la cellule émettrice par trans-endocytose. Le mécanisme de cis-inhibition (fond rouge) permet au sein de la même cellule l'inhibition du signal à travers l'interaction d'un ligand et d'un récepteur d'une même cellule qui est par la suite dégradé par la cellule.

Une fois à la membrane, l'interaction avec son ligand induit le clivage du récepteur Notch par le complexe de la γ -secrétase (Presenilin-Nicastrin-APH1-PEN2 (De Strooper et al., 1999)). Ce clivage induit la translocation au noyau de la partie intracellulaire du récepteur qui s'associe avec le complexe transcriptionnel CSL et son co-activateur Mastermind, pour former un complexe ternaire transcriptionnel actif (Petcherski and Kimble, 2000; Wu et al., 2000). Le NICD s'associe aussi avec le répresseur transcriptionnel RBPjk et le convertit en activateur transcriptionnel, aboutissant à l'expression des gènes cibles tels que HES/E(Spl) (Iso et al., 2003; Kopan and Ilagan, 2009).

3) Mécanismes de régulation de la voie Notch

a. Régulation post-traductionnelle

Le récepteur Notch possède sur sa partie extracellulaire des répétitions de domaine type EGF-like qui sont des sites de glycosylation du récepteur (Haines and Irvine, 2003). Deux principales enzymes sont impliquées ici : Ofut1 et Fringe (cf. figure 29).

Ofut1 est responsable de l'O-fucosylation (Okajima et al., 2003), mais sert également de chaperonne pour le récepteur Notch (Okajima et al., 2005). La suppression d'Ofut1 dans différents modèles conduit à des variations importantes de l'activation de la voie Notch. Fringe est une enzyme qui effectue l'O-fucosylation de certains domaines EGF-like (Moloney et al., 2000a; Moloney et al., 2000b). Chez la drosophile, Fringe possède un patron d'expression spécifique qui permet la création de cellules avec un récepteur Notch non glycosylé par Fringe et inversement. La glycosylation par Fringe induit un changement d'affinité du récepteur Notch pour son ligand : quand Fringe est présent le récepteur Notch est activé par le ligand DLL et en l'absence de glycosylation par Fringe induit au contraire une affinité pour le ligand serrate. Ces différences d'affinités induisent la création d'un compartiment dorsal et ventral sur le disque imaginal (Johnston et al., 1997) qui donne par la suite l'aile de la drosophile (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Doherty et al., 1996).

b. Régulation par les miARN

La voie Notch peut être ciblée et régulée par des miARN, qui cibleront par exemple un récepteur ou un ligand. Plusieurs miARN régulent la voie Notch, cependant peu de travaux établissent un lien direct entre un miARN spécifique et sa cible dans la voie Notch (Lou et al., 2012; Won et al., 2013). Mon travail de thèse a permis d'établir que miR-449 ciblait de manière directe Notch1, un des 4 récepteurs Notch présent chez l'Homme (Marcet et al., 2011a; Marcet et al., 2011b). Ces observations ont d'ailleurs été confirmée par une étude portant également sur miR-449 (Capuano et

al., 2011) et une autre étude portant sur d'autres miR de la même famille ayant le même site de reconnaissance de cibles (Bae et al., 2012; Kashat et al., 2012; Li et al., 2009).

Un autre exemple de miR ciblant la voie Notch est donné par miR-9, qui cible Hes1, un facteur de transcription qui entraîne l'inhibition de miR-9 (Bonev et al., 2012). Ce travail réalisé par l'équipe de Papalopulu a ainsi établi l'existence d'une boucle de régulation négative, aboutissant à des oscillations d'expression inversées pour miR-9 et de Hes1.

c. Inhibition en cis

Chez la drosophile, la création d'un tissu chimérique avec des cellules sureprimant le ligand DLL permet d'observer ce mécanisme d'inhibition en cis. Les cellules surexprimant DLL induisent une forte activation de la voie Notch dans les cellules sauvages avoisinantes reflétant la trans-activation de ligand à récepteur. Cependant, de manière surprenante, aucune marque d'activation de la voie Notch n'est observée au sein de ce groupe de cellules surexprimant le ligand. Ces observations indiquent qu'un fort niveau de ligand inhibe dans la même cellule l'activation de la voie Notch (de Celis and Bray, 1997; Micchelli et al., 1997). Cette propriété, appelée cis-inhibition, décrit la situation où le ligand interagit avec les récepteurs Notch d'une même cellule et bloque ainsi son interaction avec les cellules avoisinante et donc son activation.

d. L'inhibition latérale et les patrons de différenciation

Le concept d'inhibition latérale proposé par Simpson constitue la pierre angulaire de la voie Notch en permettant la création de véritable « patron » de différenciation au sein d'un même tissu (Simpson, 1990). Le concept de base est qu'au départ deux cellules ont des niveaux similaires de récepteurs et de ligands. L'activation en trans de la première cellule par la seconde est identique à celui de la seconde par la première. L'activation en trans induite par une cellule émettrice (via son ligand) à une cellule réceptrice du signal, entraîne l'activation de la voie Notch et donc des modifications transcriptionnelles. Il est accepté que l'activation de la voie Notch induise une diminution de l'expression du ligand dans la cellule réceptrice (Heitzler and Simpson, 1991). Ainsi nos deux cellules compensent mutuellement les signaux envoyés par l'autre cellule (cf. figure 30).

Au niveau d'un tissu, où chaque cellule est entourée de plusieurs cellules, on assiste à la création d'un « patron » de différenciation. Lorsqu'une cellule émettrice dispose d'une quantité seuil de ligands pour activer les récepteurs Notch des cellules avoisinantes, et que l'activation de la voie Notch dans ces cellules avoisinantes entraîne au niveau transcriptionnel une diminution de ligands dans ces mêmes cellules, le signal activateur retour dans la cellule émettrice va être bloqué. Au fur et

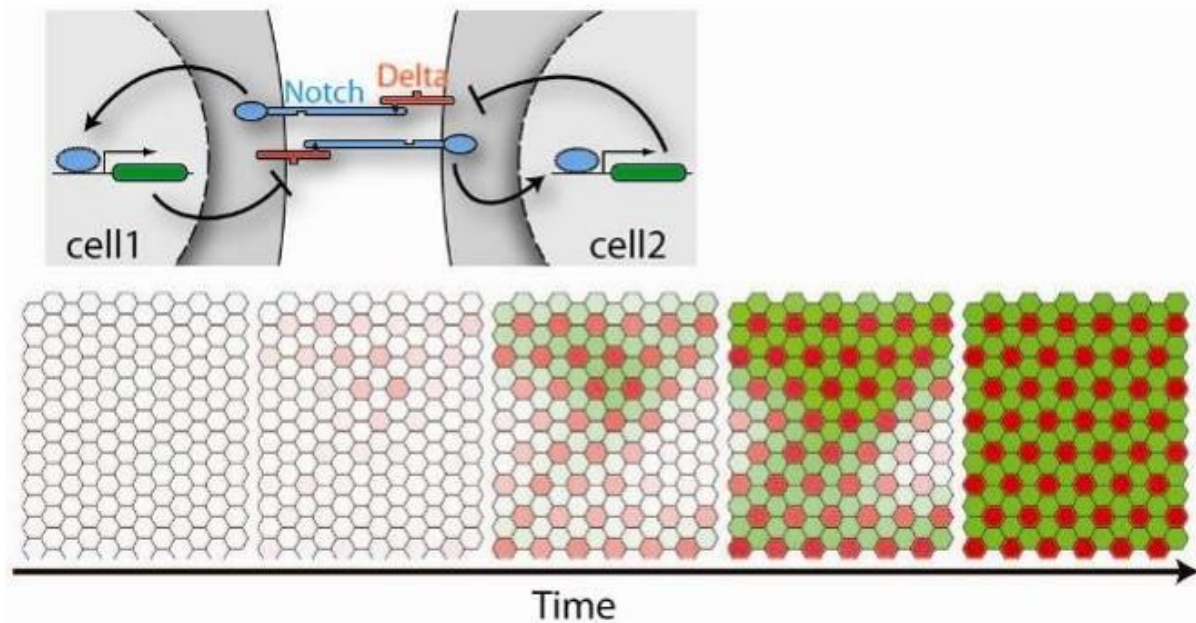


Figure 30: Détermination des patrons par la voie Notch (d'après Hori et al, 2013)

Avant que la voie Notch n'intervienne, il est admis que toutes les cellules expriment la même quantité de récepteur et de ligand. Ainsi à travers la trans-activation et la cis-inhibition, les cellules s'envoient des signaux opposés de façon mutuelle. A un moment donné, une cellule prend le dessus sur les cellules adjacentes et induit ainsi la formation d'un patron d'activation Notch. La voie Notch étant reliée à la différenciation cellulaire, on obtient la formation d'un tissu composé de différents types cellulaires suivant un patron donné.

à mesure, les niveaux du ligand dans la cellule émettrice vont augmenter, ce qui va amplifier la proportion des récepteurs dans les cellules avoisinantes. La perte d'activation dans cette cellule émettrice pourra entraîner la différenciation en un type cellulaire défini. Les cellules avoisinantes indifférenciées à ce moment pourront ensuite se différencier. L'intervention d'autres voies de différenciation en conjugaison avec la voie Notch permet d'engendrer des tissus complexes comprenant plusieurs types cellulaires.

4) *Rôle de la voie Notch dans la différenciation des cellules multiciliées*

Chez la souris l'inhibition de la voie Notch par invalidation conditionnelle d'Ofut1 et Rbpjk dans l'endoderme (dont dérivent les cellules de l'épithélium respiratoire) est caractérisée par une augmentation drastique du nombre de cellules multiciliées (Tsao et al., 2009). De plus, il a été remarqué dans les mêmes conditions une disparition des cellules Club et une diminution de la prolifération cellulaire sans affecter la gobeletogenèse. L'utilisation chez la souris d'une forme constitutivement active de Notch (NICD) induit au contraire une augmentation des cellules sécrétrices de mucus avec perte de la différenciation en cellules multiciliées dans les voies respiratoires et l'inhibition de la différenciation au niveau alvéolaire (Guseh et al., 2009). Plus récemment, une étude focalisant sur la différenciation des cellules basales de l'épithélium respiratoire en utilisant une souris TNR (Transgenic Notch Reporter : souris exprimant une GFP quand Notch est activé) a permis de suivre l'activité de Notch (Mizutani et al., 2007). Elle a permis au groupe d'Hogan de montrer lors de la régénération de l'épithélium respiratoire *in vivo* que l'activation de Notch était nécessaire pour la différenciation des cellules cylindriques. Les variations observées concordent avec les précédents résultats : une diminution de l'activation de Notch coïncide avec la différenciation en cellules multiciliées (Rock et al., 2011) alors que l'activation de la voie Notch induit la différenciation en cellule Club et cellules sécrétrices de mucus (Rock et al., 2011) comme observé précédemment (Guseh et al., 2009). *In vitro*, le blocage chimique de la voie Notch par du DAPT, un inhibiteur chimique de la γ -sécrétase, induit une augmentation de la différenciation en cellules multiciliées. De plus, nous avons montré que miR-449 jouait un rôle primordial pour la répression du ligand DLL1 et du récepteur Notch1 pour la différenciation des cellules multiciliées (Marcet et al., 2011a; Marcet et al., 2011b) (cf. partie Résultats Article 1).

Chez le xénope, l'accès à certains marqueurs des progéniteurs des cellules ciliées (CCP pour ciliated cell precursors) a permis d'approfondir l'implication de certains acteurs de la voie Notch dans la différenciation des cellules multiciliées. L'inhibition latérale, permet la spécification des cellules de la couche interne en CCP qui expriment alors de fort niveau de DLL (Deblandre et al., 1999)(cf. partie III. 2. A. 3) d). Pour la différenciation terminale en cellules multiciliées, la répression du ligand delta qui

a lieu au stade neurula, est nécessaire pour permettre l'intercalation dans la couche externe des CCP et pour la mise en place des cils motiles (Stubbs et al., 2006). Cette répression du ligand delta dans les CCP, chez le xénope comme chez l'Homme, est sous le contrôle de miR-449 qui cible seulement DLL chez le xénope (Marcet et al., 2011a; Marcet et al., 2011b).

B. La voie BMP

1) Voie canonique d'activation

Les BMP (Bone Morphogenic Protein) sont des facteurs de croissance qui appartiennent à la superfamille du TGF β (transforming growth factor b) découvert par Urist (Urist, 1965) et servent de ligands pour l'activation de la voie TGF β . On en dénombre environ une trentaine chez l'Homme avec de nombreux types de ligands différents : 3 isoformes du TGF β , 4 chaînes beta d'activine, la protéine nodal, 10 bone morphogenetic proteins (BMP) et 11 facteurs de croissance et de différenciation (notés les GDF). Chaque ligand est traduit sous forme de pro-peptide. Après clivage, il est en général homodimérisé, bien qu'il existe cependant quelques cas d'hétérodimères de BMP (Yeo and Whitman, 2001). Le dimère ainsi formé peut alors se fixer sur ses récepteurs, de type sérine/thréonine kinase transmembranaires de type I et II, pour induire l'activation de la voie. On dénombre 3 types de récepteurs de type I : les récepteurs BMP type IA (BMPRI-IA ou Alk-3) et IB (BMPRI-IB ou Alk-6) et un récepteur à l'activin de type IA (ActRI-IA ou Alk-2). Les récepteurs de type 2 sont au nombre de 3 : un récepteur aux BMP de type II (BMPRII), deux récepteurs à l'activine de type II et IIB (ActRII et ActRIIB). Ces récepteurs présentent une forte spécificité d'expression tissulaire (Danesh et al., 2009). De manière plus générale, la présence simultanée d'un récepteur de type I et de type II est indispensable à la signalisation par les BMPs : lors de la fixation du ligand, le récepteur forme un hétérotétramère actif composé de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II (cf. figure 31). Les récepteurs de type II possèdent une activité kinase permettant la phosphorylation des récepteurs de type I sur un domaine retrouvé chez tous les récepteurs de type I. Cette phosphorylation permet le recrutement des SMADs (SMAD 1/5/8) ainsi que leur phosphorylation (Kretzschmar and Massague, 1998). Cette phosphorylation initie la formation d'un complexe avec SMAD-4 qui est un médiateur commun de cette voie, grâce à laquelle a lieu une translocation vers le noyau. Une fois transloqués dans le noyau, ces complexes SMAD-4/SMAD-X, en association avec d'autres partenaires, vont contrôler l'expression des gènes cibles (Kretzschmar and Massague, 1998).

2) La voie BMP et les voies respiratoires humaines.

Au niveau pulmonaire, il a été observé de fort niveau de BMP-4 dans l'endoderme (Bellusci et al., 1996). Des souris surexprimant Noggin, un inhibiteur naturel et endogène de BMP-4, ou

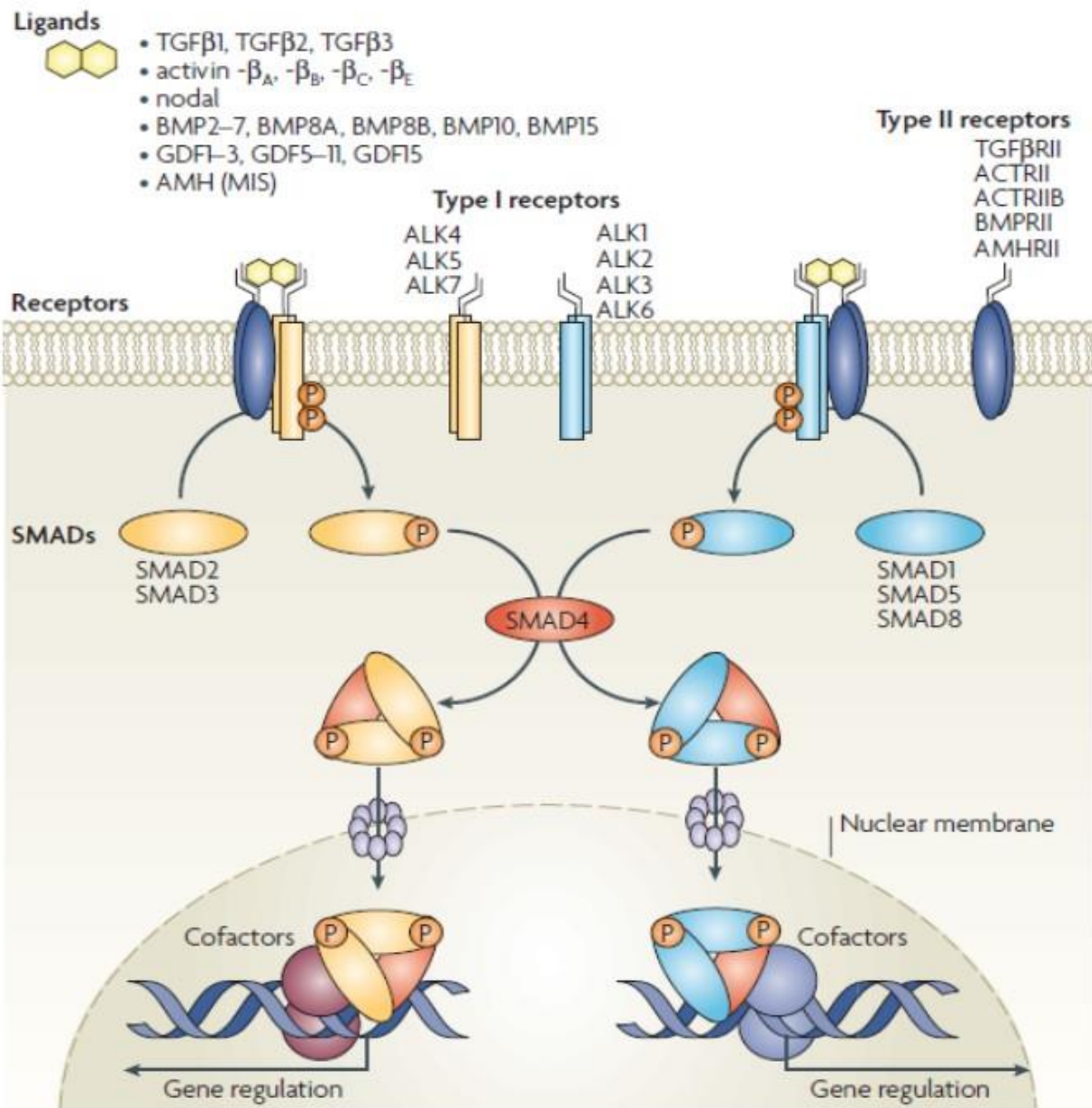


Figure 31: Voie de signalisation de BMP (d'après Schmierer et al., 2007)

La voie de signalisation des BMP fait intervenir plusieurs acteurs à différents moments. Tout d'abord les récepteurs sont constitués en deux classes: récepteurs de type I et de type II. L'association d'un ligand s'effectue par l'interaction directe avec un récepteur hétéro-dimérique de type I et de type II. Cette interaction entraîne la transduction du signal via la phosphorylation des SMAD. Ces SMAD fonctionnent en complexes qui une fois phosphorylés sont ensuite transloqués au noyau pour induire des régulations géniques.

l'expression d'un dominant négatif du récepteur Alk6 (dnAlk6) sous le contrôle du promoteur de SPC a permis d'étudier le rôle de BMP-4 lors du développement pulmonaire (Weaver et al., 1999). Des phénotypes relativement semblables sont observés dans les deux situations : une réduction de la taille des poumons associée à un défaut de la répartition entre les zones proximales et distales : diminution du nombre de cellules épithéliales dans la partie distale et au contraire augmentation du nombre de cellules épithéliales multiciliées et de cellules Club au niveau proximal (Weaver et al., 1999).

Le rôle de Noggin en tant qu'inhibiteur de BMP-4 a initialement été montré par (Re'em-Kalma et al., 1995). En outre, des travaux récents suggèrent sa capacité à bloquer d'autres BMP mais son effet sur d'autres BMP dans un contexte pulmonaire n'a pas été étudié.

Sountoulidis et collaborateurs ont utilisé une souris exprimant la GFP sous contrôle du rapporteur ID1, dont l'expression est dépendante de l'activation de la voie BMP. Ils ont ainsi pu étudier l'activation spatio-temporelle des BMP lors du développement pulmonaire et lors de la régénération chez l'adulte. Ils ont remarqué que la voie BMP est activée dans les cellules progénitrices épithéliales lors du développement pulmonaire (Sountoulidis et al., 2012). Lors de la régénération, ils ont aussi remarqué une réexpression du rapporteur (Sountoulidis et al., 2012), comme précédemment rapporté (Masterson et al., 2011). En effet, l'activation de la voie BMP *in vivo* ou *in vitro* après stimulation par BMP2, BMP4 et BMP7 (McCormack and O'Dea, 2013) induit l'expression transitoire de marqueurs mésenchymateux, comme alpha-SMA et inhibe l'E-cadherine (Masterson et al., 2011; Molloy et al., 2008), deux biomarqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (McCormack et al., 2013). Ces marques transitoires d'EMT après lésion sont le signe d'une prolifération et d'une migration préalables à une réépithélialisation de l'épithélium respiratoire (Masterson et al., 2011; Warburton and Bellusci, 2004). D'autres travaux sur les cellules souches embryonnaires de souris (ES) indiquent un lien entre voie BMP et maintien des cellules souches, suggérant un rôle équivalent de la voie BMP dans les cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire lors de son développement et de sa régénération (Qi et al., 2004; Sakaki-Yumoto et al., 2013).

Hormis le rôle de BMP dans le contrôle de la différenciation cellulaire, aucun lien direct n'a été établi jusqu'à ce jour entre voie BMP et formation des cellules multiciliées, à l'exception d'une étude montrant un lien entre la formation du cil nodal et la voie BMP : Komatsu et collaborateurs ont montré qu'une délétion du récepteur BMP de type 1 (ACVR1) dans les cellules épiblastiques de l'embryon de souris, abolissait la formation du cil nodal. Il en résultait une perte de l'asymétrie droite-gauche (Komatsu et al., 2011). En revanche, ce phénotype semble uniquement dû à la régulation du cycle cellulaire par la voie BMP : en effet l'abolition d'ACVR1 induit la perte de phosphorylation de p27 dont la déstabilisation empêche l'entrée en quiescence des cellules. Lorsque les cellules cyclent, la

formation des cils est rendue impossible, expliquant alors ce phénotype. Cependant, ces observations mettent en lumière le rôle potentiel de la voie BMP dans l'arrêt du cycle cellulaire, qui apparaît comme un pré-requis pour l'initiation de la ciliogenèse.

3) La voie BMP dans l'épiderme d'embryon de Xénope

Lors du développement embryonnaire du Xénope, un gradient BMP permet la spécification des territoires ectodermiques neuronaux et non neuronaux (De Robertis et al., 2001; Fagotto et al., 1997). Le territoire ectodermique non neuronal donnera plus tard l'épiderme de l'embryon et par l'intermédiaire d'autres voies, la spécification et la différenciation des différents types cellulaires composant cet épithélium mucocilié. Des manipulations de la voie BMP indiquent que l'activation de la voie BMP est suffisante pour la transformation du territoire ectodermique neuronal en progéniteurs non neuronaux. Au contraire, son inhibition est suffisante pour la transformation des progéniteurs non neuronaux (épidermique) en progéniteurs neuronaux (cf. figure 24) (Chang and Harland, 2007; Delaune et al., 2005). Une fois les progéniteurs non neuronaux spécifiés par la voie BMP plusieurs processus se mettent alors en place pour la formation de l'épiderme d'embryon : 1) lors de la segmentation et du stage blastula les progéniteurs non neuronaux subissent des divisions asymétriques permettant la formation de deux couches distinctes de cellules : la couche interne et la couche externe. 2) la spécification des différents types cellulaires composant l'épiderme d'embryon aura lieu lors de la gastrulation : dans la couche interne, apparaîtront les progéniteurs des cellules multiciliées, des ionocytes et des cellules basales notamment *via* la voie Notch. Les cellules sécrétrices de mucus se spécifieront dans la couche externe. 3) Lors de la neurulation, les ionocytes ainsi que les cellules multiciliées viennent s'intercaler dans la couche externe alors que les cellules basales restent dans la couche interne (cf. figure 32). Cette étape est cruciale car la différenciation de cellules multiciliées et leur intercalation s'effectue en parallèle. A la fin, la couche externe de l'épiderme d'embryon sera composée de cellules multiciliées, d'ionocytes et de cellules sécrétrices de mucus. Dans la couche interne, on retrouve les cellules basales ainsi que les progéniteurs des cellules multiciliées et les progéniteurs des ionocytes.

A l'heure actuelle, seule la voie Notch a été montrée impliquée dans la spécification des cellules de la couche interne : l'activation de la voie Notch entraîne la perte des cellules multiciliées et des ionocytes, et au contraire l'inhibition de la voie Notch induit une augmentation de cellules multiciliées et d'ionocytes intercalées. L'implication de la voie BMP dans la différenciation des différents types cellulaires n'a jamais été étudiée dans ce contexte.

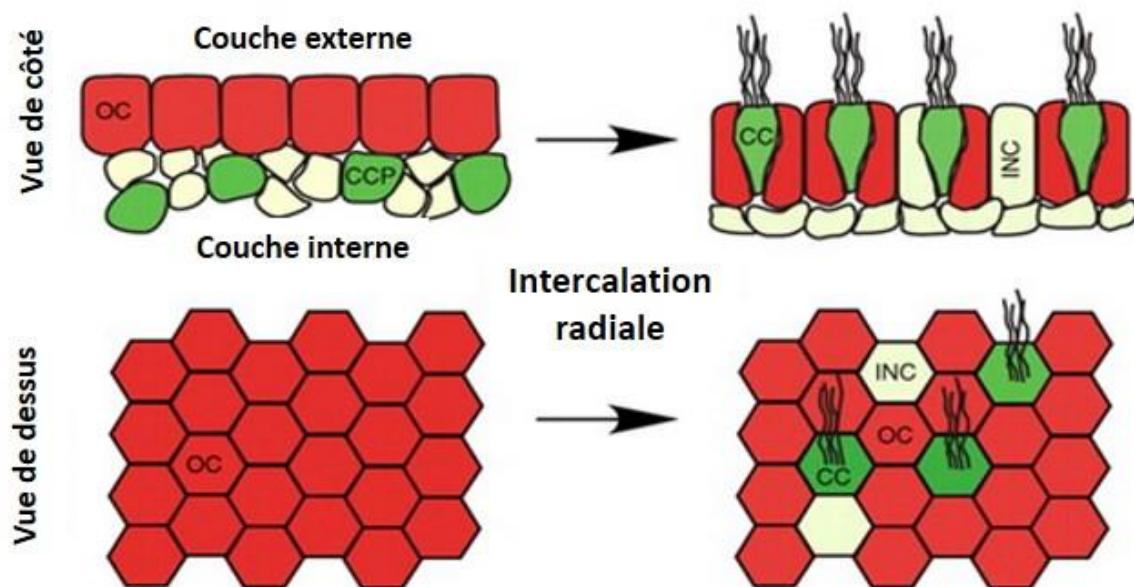


Figure 32: L'intercalation de la couche interne lors du développement de l'épiderme (d'après Stubbs et al., 2006)

Le développement des deux couches ectodermiques lors de la formation de l'épiderme d'embryon de Xénope. L'ectoderme de Xénope est divisé en deux couches distinctes: la couche interne et la couche externe (cellules en rouge) sur la partie supérieure. Une première étape correspond à la spécification des progéniteurs multiciliés (CCP, cellules en vert) et des ionocytes (cellules en jaune) via l'inhibition latérale. Une fois spécifiés, ces deux types cellulaires s'intercalent à travers la couche externe composée principalement par des cellules gobelet.

3. Polarisation des cellules multiciliées et orientation du battement ciliaire

Les cellules épithéliales multiciliées sont caractérisées par une polarisation apico-basale, dans lesquelles sont impliquées des protéines de la jonction cellulaire (cf. partie II. 2. J. 1)). Cette polarisation met en jeu un adressage et une localisation spécifiques de protéines ainsi que des interactions avec le cytosquelette d'actine, modulés par de nombreuses voies de signalisation. Parmi celles-ci, je détaillerai plus particulièrement les voies impliquant les petites GTPases (e.g. Rho GTPases) et la voie PCP (« Planar Cell Polarity »).

A. Les Rho GTPases

Les Rho GTPases de la superfamille Ras coordonnent l'orientation du cytosquelette d'actine ainsi que l'adressage de vésicules à certaines localisations dans la cellule (Symons and Rusk, 2003). Cette coordination est primordiale pour la polarisation de l'épithélium : la concentration de la machinerie de polymérisation de l'actine, mais aussi l'assemblage de l'actine et son ancrage à certains sites, contribuent à cette polarisation.

1) Le réseau d'actine

L'actine, une protéine de 42kDa qui constitue l'élément de base du cytosquelette eucaryote, représente jusqu'à 15% du poids protéique d'une cellule. Elle existe sous deux formes dans la cellule : l'actine globulaire notée actine-G ou sous forme polymérisée d'actine-F (filamenteuse). L'actine participe à de nombreux processus biologiques autres que la polarisation, comme par exemple le maintien structural, la division cellulaire, la migration, l'adhésion, l'endocytose, le trafic vésiculaire.

Dans les épithéliums polarisés, la membrane apicale des cellules épithéliales est fortement liée au réseau d'actine par l'intermédiaire de protéines membranaires faisant le lien entre la cellule et le réseau d'actine notée « ABP » (Actin Binding Protein). Les ERM (Ezrine-Radixine-Moesine), et notamment l'ezrine, sont une famille d'ABP qui participent à la stabilisation du réseau d'actine au niveau de la membrane cellulaire (Algrain et al., 1993; Bretscher, 1983), et comme nous le verrons plus bas, à l'établissement du phénotype multicilié (Gomperts et al., 2004; Huang et al., 2003).

2) Régulation de l'activité des petites GTPases

Les GTPases de la famille Rho fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui passent d'un état inactif lié au GDP, à un état actif lié au GTP. La liaison du GTP induit des changements conformationnels permettant leur association à des molécules effectrices contrôlant des voies de signalisation. Ces Rho GTPases possèdent des régulateurs permettant le passage d'un état à l'autre, cependant d'autres mécanismes de régulation ont été mis en avant. Ici, le contrôle spatio-temporel de l'activation des Rho GTPases est un mécanisme de base de leur action cellulaire. Ces mécanismes de

régulation ont fait l'objet de nombreuses revues (Cherfils and Zeghouf, 2013; Garcia-Mata et al., 2011; Hall, 2012).

L'activation des Rho GTPases fait intervenir différents niveaux de régulation :

- Echange de GDP par du GTP, modulé par des facteurs d'échange appelés GEF (Guanine exchange factors) ; La liaison du GTP aux Rho GTPases leur permet d'interagir avec leurs effecteurs.
- Activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP des Rho GTPases, favorisée sous l'action de facteurs d'activation appelés GAP (GTPase activating proteins) qui s'associent aux Rho GTPases, permettant leur dissociation de l'effecteur et induisant l'inactivation des Rho GTPases.
- Inhibition de la dissociation du GDP associé aux Rho GTPases, modulée par des régulateurs correspondant aux GDI (Guanine nucleotide dissociation inhibitors) (cf. figure 33), qui une fois associés aux Rho GTPases liées à du GDP bloquent l'échange de GDP en GTP. Ceci a pour effet le blocage des Rho GTPases dans un état inactif.
- Récemment, certaines études, y compris par notre propre équipe, ont décrit certains miARN comme de nouveaux régulateurs des petites GTPases (Liu et al., 2012a; Yu et al., 2008a).

Certains régulateurs peuvent interagir avec plusieurs Rho GTPases alors que d'autres seront spécifiques d'une Rho GTPase. Ces régulateurs sont aussi exprimés de façon tissu-spécifiques et en plus de leur activité inhibiteur/activateur des Rho GTPases, possèdent une activité chaperonne modulant ainsi l'association avec certains effecteurs des Rho GTPases actives. Il s'ensuit que les Rho GTPases peuvent exercer une diversité d'actions en fonction du contexte cellulaire et de leur localisation intracellulaire.

3) Rôle des Rho GTPases

La morphologie et la motilité cellulaire sont étroitement liées au cytosquelette d'actine. Les GTPases Rho, Rac et cdc42 apparaissent comme des éléments centraux de la régulation du cytosquelette d'actine. L'activation de cette famille de protéines induit le recrutement de nombreux effecteurs qui gouvernent les mouvements cellulaires. Chaque membre de cette famille régule différentes voies de signalisations impliquées dans l'assemblage de différents types de structures de filaments d'actine. Les protéines Rho (RhoA) sont plutôt impliquées dans la formation des fibres de stress d'actine. Ces fibres de stress sont des structures contractiles, formées d'actine et de myosine qui sont retrouvées dans de nombreux types cellulaires non musculaires. Ces fibres permettent l'adhésion, la motilité et la morphologie cellulaire.

Les GTPases Rac sont quant à elles impliquées dans la formation de structures associées aux lamellipodes et aux micro-domaines membranaires.

Les GTPases Cdc42, sont plutôt impliquées dans la formation des filopodes, qui sont des protrusions d'actine en forme de doigt au niveau de la membrane.

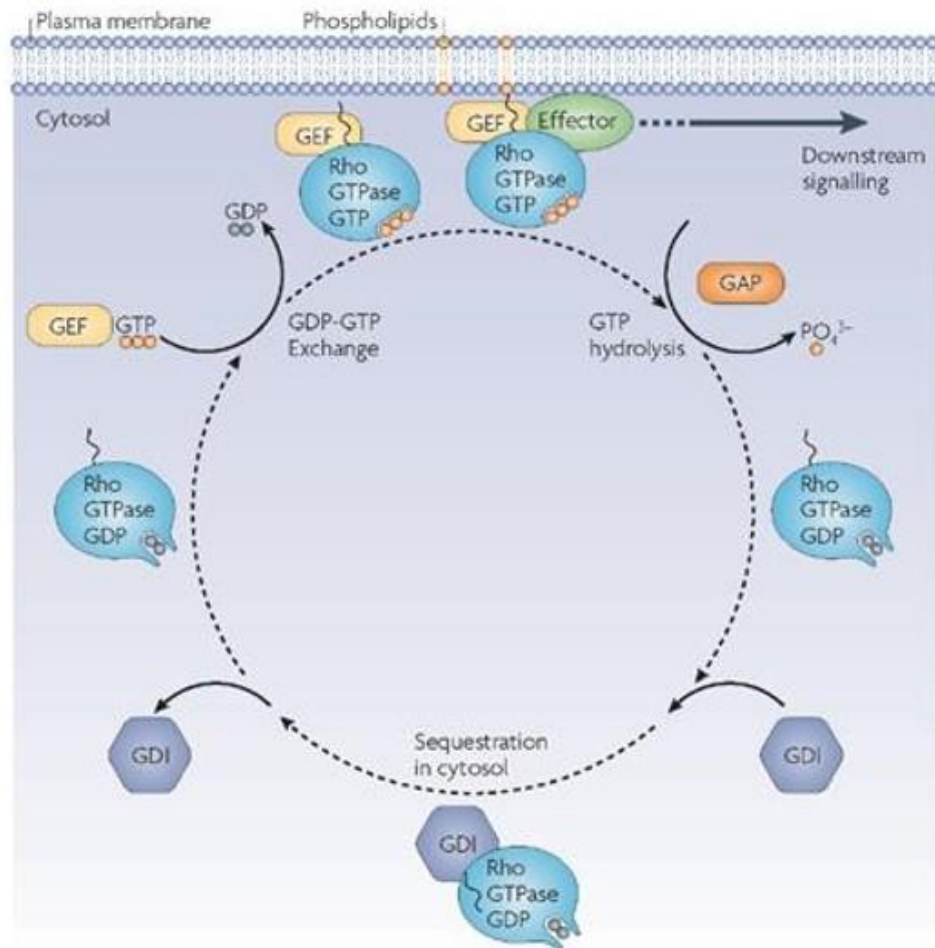


Figure 33: Mécanismes de régulation de l'activité des petites GTPases (d'après Iden et al, 2008)

L'activité des petites GTPases dépend de leur association avec du GDP ou du GTP. La forme inactive, liée au GDP, est activée par échange de GDP en GTP grâce à l'intervention des facteurs d'échange (GEF). La petite GTPase active et associée alors à la membrane, interagit avec ses effecteurs induisant ainsi un signal dans la même cellule. De manière opposée, il existe deux types de régulateurs négatifs: les GAP qui induisent l'hydrolyse du GTP en GDP, et les GDI qui bloquent l'activation des petites GTPases, en les séquestrant dans le cytoplasme.

Dans chacune de ces situations, les protéines Rho GTPases permettent un réarrangement du cytosquelette d'actine par polymérisation de manière à coordonner les mouvements cellulaires (voir revue détaillée de (Raftopoulou and Hall, 2004).)

4) Rôle des petites GTPases dans le tissu épithélial

Dans les épithéliums, le cytosquelette d'actine joue un rôle central dans la formation et le maintien des jonctions intercellulaires. Par exemple, la latrunculin A, un agent dépolymérisant du réseau d'actine, induit l'internalisation des protéines ZO-1 et de la claudine-4, deux éléments clefs des jonctions serrées (Shen and Turner, 2005). Dans ce contexte, les RhoGTPases cdc42 et Rac sont associées aux complexes jonctionnels et sont suggérées ainsi en être des régulateurs directs.

Lors de la réparation épithéliale, l'activation ou l'inhibition de l'activité de RhoA ainsi que la surexpression de Rac1 grâce à l'emploi de formes constitutivement actives ou inactives empêche la refermeture de la blessure dans des cellules bronchiques 16HBE14o-, suggérant que la régulation de l'activité de RhoA et de Rac1 doit être finement régulée pour permettre la réparation de l'épithélium (Desai et al., 2004). Initialement impliquées dans les réarrangements du cytosquelette d'actine, certaines GTPases comme RhoA peuvent aussi induire certains changements épigénétiques et donc contrôler la différenciation cellulaire (McBeath et al., 2004). De manière intéressante, de nombreux travaux de l'équipe de Schleger ont étudié l'inhibiteur Y27632 de la kinase ROCK, une kinase effectrice de RhoA, dans la reprogrammation des cellules épithéliales (Liu et al., 2012b). Partant sur la mise en culture de cellules épithéliales de prostate et de kératinocytes, ces auteurs ont observé lors de la mise en culture avec du Y27632, une immortalisation des cellules épithéliales avec une prolifération accrue, et un maintien des marqueurs de cellules épithéliales non différenciées. De manière convaincante, aucun changement dans le caryotype des cellules n'est observé et après un nombre élevé de passages, les cellules épithéliales ont conservé leur capacité de différenciation (Chapman et al., 2010; Liu et al., 2012b). Récemment, la même équipe a obtenu des résultats similaires sur des cellules épithéliales respiratoires (Supryniewicz et al., 2012). L'inhibiteur Y27632 permet, lors de la phase de prolifération et d'amplification, aux cellules épithéliales respiratoires de conserver leur capacité à reformer un épithélium pleinement différencié même après plusieurs passages. Ces derniers résultats indiquent qu'en plus du rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine, ces GTPases jouent un rôle important dans le contrôle de la différenciation de certains types cellulaires et pourraient notamment être impliquées dans la différenciation de l'épithélium respiratoire (McBeath et al., 2004).

5) Le rôle de la voie RhoA dans la ciliogénèse

Le remaniement apical du réseau d'actine est une étape précoce indispensable à la biogénèse des cils motiles dans les cellules multiciliées (Hoey and Gavin, 1992; Sandoz et al., 1988). Dans les

cellules multiciliées de l'épithélium respiratoire ainsi que dans l'épiderme d'embryon de xénope (Park et al., 2006b), un enrichissement apical d'actine est nécessaire pour permettre l'ancrage des corps basaux néo-synthétisés et l'orientation des cils motiles (Vladar and Axelrod, 2008).

Au cours des dernières années, il a été montré que FOXJ1 était un acteur important pour l'ancrage des corps basaux au pôle apical des cellules multiciliées. De plus, FOXJ1 contrôle l'activation de la voie RhoA, permettant le remodelage du cytosquelette d'actine et la localisation apicale d'ezrine dans les cellules multiciliées (Gomperts et al., 2004; Pan et al., 2007; You et al., 2004). En effet, l'activation de RhoA induit une activation de la kinase effectrice ROCK, qui phosphoryle l'ezrine, provoquant son changement conformationnel qui lui permet d'interagir avec l'actine-F au pôle apical des cellules (Bretscher et al., 2002). Ainsi, l'ezrine s'enrichit au pôle apical des cellules avant l'apparition des premiers cils motiles (Huang et al., 2003). L'ezrine peut aussi se lier à des protéines transmembranaires comme EBP50 (ERM-binding phosphoprotein 50 ou NHERF) (Reczek et al., 1997). EBP50 se lie à de nombreuses protéines transmembranaires importantes à la fonction de l'épithélium respiratoire, comme CFTR ou les récepteurs bêta-2 adrénergiques (Hall et al., 1998; Reczek et al., 1997; Shenolikar and Weinman, 2001). Ainsi, l'ezrine joue un rôle clé dans l'organisation et la régulation de nombreuses protéines transmembranaires à la membrane apicale. Dans les souris invalidées pour FOXJ1, Gomperts et collègues observent que le traitement avec un inhibiteur de la calpaïne, qui stabilise le cytosquelette d'actine, permet la relocalisation de l'ezrine et de l'EBP50 à la membrane apicale de l'épithélium respiratoire. De manière plus surprenante, ce traitement induit aussi la formation des cellules multiciliées mais avec la présence de cils de type « 9+0 », cette configuration serait expliquée par l'absence de FOXJ1 (Gomperts et al., 2004). L'analyse de souris invalidée pour FOXJ1 révèle des anomalies du cytosquelette d'actine avec notamment la perte de la localisation apicale de l'ezrine (Huang et al., 2003). En l'absence de FOXJ1, il y aurait donc un défaut d'activation de la voie RhoA, avec pour conséquence une perte de la localisation apicale de l'ezrine. Ainsi, ces différents travaux suggèrent que la localisation de l'ezrine pourrait jouer un rôle primordial dans la localisation et/ou l'ancrage des corps basaux au cytosquelette apical d'actine.

Un autre acteur est nécessaire pour l'assemblage des corps basaux au cytosquelette d'actine dans l'épiderme d'embryon de xénope : Dishevelled (Dvl). Je détaillerais dans la partie suivante la voie PCP dont Dvl est un acteur central (cf partie III. 3. B). Il est connu que Dvl a comme partenaire RhoA (Habas et al., 2001). Des protéines RhoA fluorescentes localisent au pôle apical des cellules multiciliées et une forme active de RhoA localise spécifiquement au niveau des corps basaux où Dvl est retrouvé (Park et al., 2008). Park et collègues ont montré que Dvl régulait la ciliogenèse en permettant l'ancrage des corps basaux au cytosquelette d'actine via l'activation de RhoA, cependant sans affecter l'enrichissement apical d'actine dans les cellules multiciliées (Park et al., 2008).

B. La voie de la polarité planaire PCP (« Planar Cell Polarity »)

L'orientation des cils a un impact direct sur l'orientation du battement ciliaire. Or, depuis quelques années de nombreuses publications portent sur l'implication de la voie PCP dans l'orientation des cils.

1) Les acteurs de la voie PCP

Chez les vertèbrés, la voie de signalisation PCP comprend de nombreuses protéines transmembranaires : Vangl (1 et 2), Celsr (1,2 et 3) et les protéines Frizzled (Fz) dont le nombre varie au sein des vertèbrés, ainsi que des protéines cytoplasmiques : Dvl (1,2 et 3) et Prickle ou Pk (1 et 2). Ces protéines sont retrouvées localisées dans la cellule au niveau cortical et de manière asymétrique de manière à transmettre à la cellule des signaux de polarisation. Aussi, il existe des boucles d'amplification entre cellules adjacentes qui transmettent l'asymétrie d'une cellule à une autre, permettant ainsi l'organisation ou l'orientation de certaines structures au sein d'un même tissu : c'est le cas des cils motiles dans l'épithélium respiratoire où la voie PCP permet au sein du tissu respiratoire d'orienter le battement ciliaire dans une direction unique. Cependant, même si le nombre de travaux décrivant l'asymétrie de ces acteurs augmente chaque année, les mécanismes précis mis en jeu restent encore peu connus.

2) La voie PCP et l'orientation du battement ciliaire

La clairance mucociliaire chez l'Homme est un mécanisme décrit depuis longtemps. Malgré cela, les premières études s'intéressant à la direction du battement ciliaire sont venues du xénope et plus particulièrement de l'équipe de Wallingford, qui a montré que Dvl, Frizzled, Vangl2 ont un rôle important dans l'épiderme de xénope pour l'orientation des cils des cellules multiciliées, ainsi que dans d'autres tissus (pour revue voir (Wallingford, 2010)). Les travaux effectués montrent l'existence de deux types principaux de polarité dans le cas des cellules multiciliées : 1) la polarité rotationnelle, où l'orientation de manière uniforme des cils au sein d'une même cellule permet la propulsion du fluide dans une même direction à l'échelle d'une seule cellule. 2) la polarité tissulaire, où l'orientation du fluide dans une direction unique passe par l'établissement et la coordination de l'ensemble des cellules multiciliées au sein du tissu entier.

Même si les différents acteurs sont encore peu connus, de nombreux travaux chez le xénope et le poisson zèbre ont permis d'identifier des acteurs clés dans ces polarités. Cependant, aucun travail sur le rôle de la voie PCP dans les voies respiratoires n'avait été effectué jusqu'au travail par Vladar et collaborateurs, effectué chez la souris (Vladar et al., 2012). Ceci est très certainement un des travaux les plus aboutis effectués dans un tissu cilié chez les mammifères, qui confirme de nombreux travaux effectués chez le xénope.

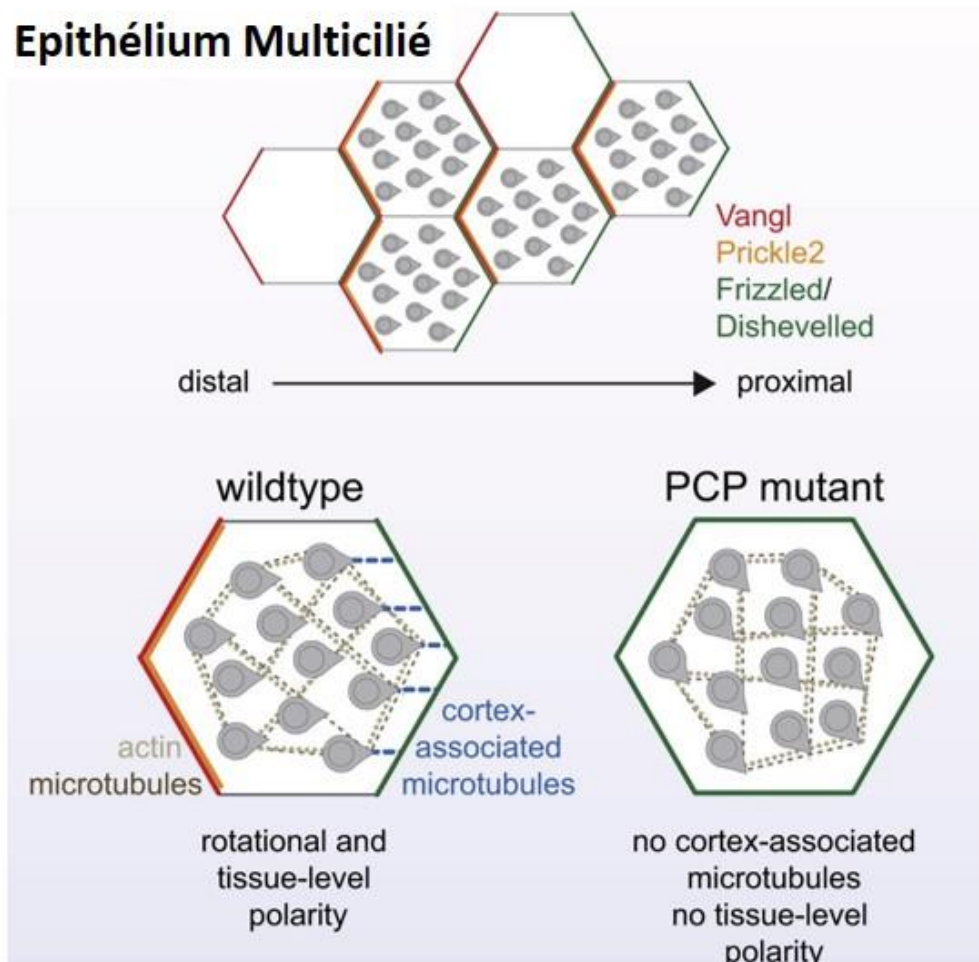


Figure 34: La voie PCP dans les cellules multiciliées (Vladar et al., 2012)

La voie des PCP (Planar Cell Polarity) contrôle l'orientation des cils motiles des cellules multiciliées des voies respiratoires. Pour cela, les différents acteurs sont distribués asymétriquement entre la partie distale et la partie proximale des voies respiratoires, de plus cette action est faite en coordination au niveau du tissu à travers des signaux non-cellulaire autonomes. Comme indiqué Vangl (en rouge) et Prickle2 (en jaune) localisent à la partie distale de la cellule alors que Frizzled et Dishevelled (en vert) localisent à la partie proximale. Ces localisations asymétriques font intervenir le réseau de microtubules, et sont nécessaires pour l'orientation des microtubules et du réseau d'actine lors de l'ancrage des corps basaux au niveau du pôle apical de la cellule. Lors de la mutation de certains acteurs de la voie PCP, il y a une perte de l'orientation des corps basaux et donc du mouvement ciliaire affectant ainsi la clairance mucociliaire.

Avant même l'apparition des cils, une localisation subcellulaire asymétrique de certains acteurs clés de la voie PCP est observée et de manière impressionnante, cette localisation subcellulaire est identique chez d'autres mammifères. Ainsi Fz3/6 et Dvl1/3 localisent au niveau de la partie proximale de la cellule, alors qu'à la partie distale est retrouvé Vgl1/2 et Pk1/2 (cf. figure 34). Comme chez le xénope, Dvl2 localise non pas de façon asymétrique mais au niveau des corps basaux (Park et al., 2008).

De précédents travaux chez la drosophile montrent que les MT sont importants pour la localisation asymétrique de ces protéines (Shimada et al., 2006). De plus, ces protéines PCP localisent avec le réseau de MT (Shimada et al., 2006). Le traitement au nocodazole, une drogue dépolymérisant les MT, abolit partiellement la localisation asymétrique des protéines PCP observées. Ces résultats indiquent que le transport vésiculaire est un élément central dans la localisation asymétrique des protéines de la voie PCP (Vladar et al., 2012).

Les auteurs relient aussi la voie PCP à la formation du réseau de MT reliant les corps basaux entre eux au sein d'une même cellule. Il existe en effet un remodelage actif du cytosquelette d'actine ainsi que du réseaux des MT de façon à interconnecter les corps basaux via leurs appendices (Werner et al., 2011). Cet aspect agit directement sur la polarité rotationnelle évoquée auparavant. Une modification post-traductionnelle de la tubuline, la tyrosination, est enrichie de manière asymétrique : les corps basaux sont reliées à la membrane par ces tubulines modifiées et la perturbation de la voie PCP entraîne la perte de l'orientation de ces tubulines tyrosinées (Vladar et al., 2012). De manière élégante, les auteurs ont utilisé des co-cultures de cellules sauvages et de cellules mutantes pour la voie PCP, montrant que la tubuline tyrosinée est distribuée de manière asymétrique non pas dans les cellules sauvages mais dans l'ensemble des cellules dont la partie proximale est en contact avec une cellule sauvage. Ces observations suggèrent ainsi que la polarisation des MT est effectuée en concert avec les cellules attenantes (Vladar et al., 2012). Ces résultats sont confirmés par des mutants de Vgl qui présentent des défauts de polarité tissulaire, indiquant bien que la voie PCP est nécessaire pour l'établissement d'une polarisation des MT et du réseau d'actine des cellules multiciliées au sein d'un même épithélium (Vladar et al., 2012). Il est cependant important de noter que dans ces mutants Vgl, la polarité rotationnelle n'est pas affectée. Des études chez le xénope suggèrent que la voie PCP fixe une direction aux cils motiles dont le battement crée un flux directionnel. Ce flux exerce des forces hydrodynamiques qui définit la polarité rotationnelle au sein d'une cellule multiciliée (Mitchell et al., 2009). Les observations de Vladar et collaborateurs, montrent la séparation entre les deux types de polarité : rotationnelle et tissulaire. Cette séparation est renforcée par le fait que certains mutants affectant la synthèse des cils n'induisent pas de perturbation de la polarité tissulaire (Guirao et al.,

2010). Ainsi certaines questions restent posées quant à l'implication de certains acteurs de la voie PCP dans ces différents types de polarités.

Nous avons vu dans cette introduction que les cils sont des structures conservées au cours de l'évolution et sont indispensables à certaines fonctions de l'organisme. La différenciation des MCC est un processus complexe contrôlé par une succession d'événements sous-contrôle de certaines voies de signalisation. Ces voies sont elles-mêmes finement régulées par de nombreux facteurs pour aboutir à la formation des cils motiles. Les miARN apparaissent comme de nouveaux acteurs capables de réguler et d'interconnecter simultanément de nombreuses voies de signalisation afin de contrôler des processus biologiques distincts. Dans ce contexte, nous nous sommes à déterminer le rôle de certains miARN dans la différenciation des MCC.

Résultats

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, la différenciation des épithéliums multiciliés est un processus complexe et dynamique. La caractérisation du transcriptome au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain réalisée dans notre équipe ainsi que dans un autre laboratoire (Ross et al., 2007) a permis de mettre en évidence le nombre élevé de gènes modulés durant ce processus. Alors qu'une étude suggérait un rôle probable des miARN dans la morphogénèse pulmonaire chez la souris (Harris et al., 2006), mon laboratoire d'accueil a été le premier à émettre l'hypothèse que certains miARN joueraient un rôle dans le processus de différenciation des épithéliums multiciliés.

Avant mon arrivée au laboratoire, des répertoires de miARN au cours de la différenciation avaient été effectués. L'induction très forte des familles de miARN miR-449 et miR-34 dans les cellules multiciliées lors de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain avait déjà été observée par plusieurs approches indépendantes (microarray, séquençage, qRT-PCR, hybridation in situ). La famille miR-449 étant induite de plus de 1000 fois, le premier objectif de mon projet de thèse a été de déterminer l'impact fonctionnel de miR-449 au cours de la différenciation des cellules multiciliées. Mon deuxième objectif a été de tenter d'élucider les différents mécanismes d'action mis en jeu. Dans cette perspective, nos travaux ont conduit à l'étude du rôle des voies de signalisation Notch et BMP, deux voies majeures souvent interconnectées et impliquées dans la différenciation cellulaire, ainsi que celle des petites GTPases dans le contrôle du phénotype multicilié.

Mon travail a donné lieu à cinq articles dont un soumis et un autre en cours de rédaction.

Article 1: Marcet B, Chevalier B., Luxardi G., Coraux C, Zaragosi L-E, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldman R, Kodjabachian L and Barbry P. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature Cell Biology*, (2011), (6):694-701.

Article 2: Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L & Barbry P. microRNA-based silencing of Delta/Notch signalling promotes multiple cilia formation. 2011. *Cell Cycle* ; 10:17, 1-7

Article 3: Chevalier B, Kodjabachian L, Coraux C, Barbry P & Marcet B. MicroRNAs control biosynthesis of motile cilia in vertebrates. *Médecine/sciences* 2011 ; 27 : 671-3

Article 4 en phase de soumission: Chevalier B., Adamiok A., Merecey O., Zaragosi L-E, Pasini A., Kodjabachian L, Barbry P & Marcet B. miR-449 controls apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase signaling.

Article 5 en cours de rédaction : Cibois, M.* , Luxardi, G.* , Chevalier, B.* , Thomé, V., Barbry, P., Marcet, B.\$ and Kodjabachian, L.\$. BMP signalling plays a prominent role in vertebrate mucociliary epithelium differentiation during development and regeneration.

I. MiR-449 contrôle la multiciliogenèse en reprimant la voie Delta/Notch chez les vertébrés.

Article 1: Marcet B, **Chevalier B.**, Luxardi G., Coraux C, Zaragosi L-E, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldman R, Kodjabachian L and Barbry P. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature Cell Biology*, (2011), (6):694-701.

Article 2: Marcet B, **Chevalier B**, Coraux C, Kodjabachian L & Barbry P. microRNA-based silencing of Delta/Notch signalling promotes multiple cilia formation. 2011. *Cell Cycle* ; 10:17, 1-7

Article 3: **Chevalier B**, Kodjabachian L, Coraux C, Barbry P & **Marcet B**. MicroRNAs control biosynthesis of motile cilia in vertebrates. *Médecine/sciences* 2011 ; 27 : 671-3

Contexte de l'étude.

Les épithéliums mucociliés sont morphologiquement similaires au sein des vertébrés. Constitués notamment par la présence de cellules multiciliées, où plusieurs centaines de cils vibratiles sont présents au pôle apical de ces cellules. Leur battement coordonné permet un transport vectoriel des fluides et des macromolécules. L'homme possède un épithélium mucocilié tapissant les voies respiratoires et dont le battement ciliaire est nécessaire pour la clairance mucociliaire. Comme nous l'avons vu dans la partie introductive (cf. partie II. 3. B. 2) a), l'épiderme d'embryon de Xénope est un épithélium mucocilié présentant de fortes similitudes avec l'épithélium respiratoire humain, en faisant ainsi un modèle pertinent pour des études comparatives de la multiciliogenèse.

Les mécanismes génomiques gouvernant la différenciation des cellules multiciliées demeurent encore largement inconnus. Dans ce contexte, nous avons exploré le rôle des miARN dans la différenciation des épithéliums mucociliés à partir de nos deux modèles d'étude : l'épithélium respiratoire humain développé dans notre laboratoire ainsi que dans celui de Christelle Coraux (Inserm, Reims), et l'épiderme d'embryon de Xénope, développé par l'équipe de Laurent Kodjabachian à l'IBDML de Marseille.

Résultats obtenus

MiR-449 est induit dans les cellules multiciliées

Nous avons effectué et comparé les répertoires d'expression des miARN à partir de cellules multiciliées et de cellules non-ciliées d'épithélium respiratoire humain ou d'épiderme d'embryon de Xénope. Nous avons ainsi observé que les familles miR-449 (miR-449a, miR-449b et miR-449c) et miR-34 (miR-34b/c) étaient les plus fortement régulées dans les cellules multiciliées des deux espèces. Le différentiel d'expression d'un facteur 1000 de miR-449 dans les cellules multiciliées nous a conduits à focaliser notre étude sur cette famille de miARN. Des hybridations *in situ* indiquent une expression spécifique de miR-449 dans les cellules multiciliées. De plus, dans le modèle humain, les profils des miARN par séquençage haut-débit ainsi que par « microarray » de cellules multiciliées et de cellules basales obtenues par tri cellulaire (FACSaria®), confirment un fort enrichissement de la famille miR-449 dans les cellules multiciliées comparé aux cellules basales.

Etant donné la forte induction de miR-449 dans les cellules multiciliées, nous avons cherché à déterminer son impact fonctionnel dans la différenciation des cellules multiciliées.

MiR-449 est nécessaire pour la multiciliogenèse

La multiciliogenèse est un processus nécessitant plusieurs étapes successives : 1) un arrêt du cycle cellulaire, suivie par 2) une centriologénèse massive correspondant à la synthèse de centaines de corps basaux dérivés de centrioles néo-synthétisés 3) la migration et l'ancrage de ces corps basaux à la membrane apicale ayant préalablement subi une restructuration de son réseau apical d'actine. Ces corps basaux servent alors de centres d'organisation des MT permettant l'assemblage des axonèmes des cils motiles. L'invalidation de miR-449 dans nos deux modèles d'étude entraîne un blocage de la formation des cils motiles, caractérisé par une forte réduction du nombre de cellules multiciliées. Par ailleurs, nous n'avons pu détecter des marquages de corps basaux ou de multiples centrioles dans les cellules invalidées pour miR-449. Ces résultats suggèrent que miR-449 serait nécessaire pour la multiciliogenèse à une étape précoce de différenciation, avant la centriologénèse. De manière intéressante, l'invalidation de miR-449 dans l'épiderme de grenouille n'affecte pas l'apparition des progéniteurs des cellules multiciliées, indiquant que miR-449 contrôle la différenciation terminale mais pas la spécification de ces progéniteurs.

MiR-449 contrôle la multiciliogenèse en ciblant la voie Delta/Notch

Le mécanisme d'action majeur des miARN est de réprimer l'expression de leurs cibles. Ainsi, afin de déterminer le mécanisme d'action par lequel miR-449 contrôle la multiciliogénèse, nous avons cherché à identifier ses cibles principales à l'aide d'analyses transcriptomiques. Nous avons pour cela utilisé notre modèle *in vitro* de différenciation que nous avons comparé à des cellules épithéliales respiratoires surexprimant miR-449. Ces études ont été couplées à l'utilisation d'outils bioinformatiques de prédiction de cibles. Ainsi, nous avons déterminé deux cibles potentielles de miR-449 conservées entre les deux espèces étudiées: le récepteur Notch1 et son ligand Delta-1 (Dll1).

Des expériences de transfection de vecteur d'expression chimérique contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du 3'-UTR de Dll1 ou de Notch1, révèlent une forte diminution de l'activité luciférase en réponse à la co-transfection de miR-449. De plus, des mutations ponctuelles des sites de reconnaissance de miR-449 sur les 3'-UTR de Dll1 et de Notch1, restaurent l'activité luciférase lors de la surexpression de miR-449. Ces résultats indiquent que miR-449 interagit spécifiquement avec le 3'-UTR de nos deux cibles d'intérêt.

En outre, la surexpression de miR-449 dans les cellules épithéliales respiratoires conduit à une diminution d'expression à la fois du transcrit et de la protéine de Dll1 et de Notch1. Inversement, le blocage de miR-449 au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire entraîne des effets opposés, à savoir une augmentation d'expression de Dll1 et Notch1. Par ailleurs, dans l'épithélium respiratoire humain nous avons pu déterminer que l'expression protéique de Dll1 et Notch1 était majoritairement exclue des cellules multiciliées qui expriment miR-449. L'ensemble de ces résultats nous suggèrent fortement que Dll1 et Notch1 sont bien des cibles physiologiques de miR-449 dans un épithélium respiratoire humain natif. Chez le xénope, il était connu que Dll1 est fortement exprimé dans les progéniteurs multiciliés puisqu'il diminue lors de leur différenciation terminale (Deblandre et al., 1999). Nous avons observé que le transcrit *Dll1* diminuait bien lors de l'induction de miR-449 ; de plus le blocage de miR-449 induit une augmentation de *Dll1*. En revanche, aucun changement n'est observé quant à l'expression de Notch1 lors de l'invalidation de miR-449.

Nous avons ensuite voulu déterminer l'impact fonctionnel du contrôle de la voie Notch par miR-449 dans le contexte de la multiciliogénèse sur nos deux modèles. Un blocage de la voie Notch dans le modèle humain par du DAPT (un inhibiteur chimique de la γ -sécrétase), et chez le Xénope en invalidant Dll1 et Notch1 à l'aide de morpholinos, potentialise la multiciliogénèse, confirmant que l'inhibition de la voie Notch est bien nécessaire pour la multiciliogénèse dans les deux espèces. Par ailleurs, chez le Xénope, l'injection d'un transcrit Dll1 sans son 3'-UTR, bloque la multiciliogénèse sans affecter l'apparition de progéniteurs de cellules multiciliées, mimant l'invalidation de miR-449. Ce

résultat suggère que Dll1 serait la cible privilégiée de miR-449 dans le modèle Xénope. Afin de démontrer que le contrôle de la multiciliogénèse par miR-449 impliquait bien une répression spécifique de la voie Notch par miR-449 dans nos deux modèles, nous avons utilisé une approche de protection de cible. Cette approche consiste à transfecter ou à injecter un oligonucléotide complémentaire du site conservé de miR-449 dans le 3'-UTR de *Notch1* ou de Dll1 afin de bloquer spécifiquement sur cette cible l'action du miR-449 endogène et de tester son impact fonctionnel. Si l'effet fonctionnel de miR-449 passe bien par la répression spécifique de cette cible, on peut mimer le blocage induit par l'invalidation spécifique de miR-449 en empêchant son interaction avec cette cible spécifique. Nous avons pu observer qu'une telle protection de Notch1 dans l'épithélium respiratoire inhibait bien la multiciliogénèse. La même approche expérimentale a été conduite chez le Xénope en abolissant l'action de miR-449 sur sa cible Dll1 : on observe alors une augmentation du transcrit Dll1, qui apparaît donc bien comme une cible fonctionnelle de miR-449. Par ailleurs, la protection de Dll1 contre l'action de miR-449, abolit la multiciliogénèse sans affecter l'apparition des progéniteurs de cellules multiciliées, mimant ainsi l'invalidation de miR-449. Une invalidation de la voie Notch reverse l'effet de l'invalidation de miR-449 en restaurant la multiciliogénèse.

Nos travaux ont ainsi permis de démontrer que la répression de la voie Delta/Notch par miR-449 est requise pour le déclenchement de la multiciliogénèse chez les vertébrés, mettant en lumière la conservation fonctionnelle d'un miARN et de son mécanisme d'action.

Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway

Brice Marcet^{1,2}, Benoît Chevalier^{1,2,11}, Guillaume Luxardi^{3,4,11}, Christelle Coraux^{5,6,11}, Laure-Emmanuelle Zaragosi^{1,2}, Marie Cibois^{3,4}, Karine Robbe-Sermesant^{1,2}, Thomas Jolly^{5,6}, Bruno Cardinaud^{1,2,7,8}, Chimène Moreilhon^{1,2,9}, Lisa Giovannini-Chami^{1,2,10}, Béatrice Nawrocki-Raby^{5,6}, Philippe Birembaut^{5,6}, Rainer Waldmann^{1,2}, Laurent Kodjabachian^{3,4,12} and Pascal Barbry^{1,2,12,13}

Multiciliated cells lining the surface of some vertebrate epithelia are essential for various physiological processes, such as airway cleansing^{1–3}. However, the mechanisms governing motile cilia biosynthesis remain poorly elucidated. We identify miR-449 microRNAs as evolutionarily conserved key regulators of vertebrate multiciliogenesis. In human airway epithelium and *Xenopus laevis* embryonic epidermis, miR-449 microRNAs strongly accumulated in multiciliated cells. In both models, we show that miR-449 microRNAs promote centriole multiplication and multiciliogenesis by directly repressing the Delta/Notch pathway. We established Notch1 and its ligand Delta-like 1 (DLL1) as miR-449 *bona fide* targets. Human DLL1 and NOTCH1 protein levels were lower in multiciliated cells than in surrounding cells, decreased after miR-449 overexpression and increased after miR-449 inhibition. In frog, miR-449 silencing led to increased *Dll1* expression. Consistently, overexpression of *Dll1* mRNA lacking miR-449 target sites repressed multiciliogenesis, whereas both *Dll1* and *Notch1* knockdown rescued multiciliogenesis in miR-449-deficient cells. Antisense-mediated protection of miR-449-binding sites of endogenous human *Notch1* or frog *Dll1* strongly repressed multiciliogenesis. Our results unravel a conserved mechanism whereby Notch signalling must undergo miR-449-mediated inhibition to permit differentiation of ciliated cell progenitors.

Motile cilia are microtubule-based organelles that develop from the apical surface of specialized cells in varying numbers, ranging from one to several hundred per cell^{1,2}. They have important mechanical and sensory roles^{1,2}, highlighted by the fact that a wide variety of human pathologies, such as chronic airway diseases (including primary ciliary

dyskinesia, cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease), Bardet–Biedl syndrome and reproductive disorders^{1,2}, are associated with ciliary defects. Multiciliated epithelia are morphologically conserved among vertebrates, indicating that the key pathways that control multiciliogenesis are also conserved across this phylum^{1,2,4–6}. We formed a hypothesis that microRNAs, a class of small regulatory noncoding RNAs (refs 7–9), may be important regulators of vertebrate multiciliogenesis. To test our hypothesis, we examined the microRNA expression changes during ciliogenesis in two models derived from evolutionarily distant tetrapods: primary cultures of differentiated human airway mucociliary epithelial cells (HAECs) grown at an air–liquid interface^{10–12} (Supplementary Fig S1a,b), and mucociliary epidermis of *Xenopus* embryos^{4,6}. Both models recapitulate the different steps leading to terminal differentiation into multiciliated cells, characterized by the growth of hundreds of motile cilia at the apical surface of each cell. For HAEC primary cultures, we established microRNA signatures by high-throughput sequencing (HTS) at four characteristic time points of the airway barrier regeneration: proliferation, immediately after the establishment of an air–liquid interface (ALI-D0); polarization, which was typically observed after 7 days (ALI-D7); onset of ciliogenesis, after 14 days (ALI-D14); and terminal differentiation, after 21 days (ALI-D21). For *Xenopus laevis*, we sequenced microRNAs from ectoderm explants at stage 11.5 (gastrula), which is before the appearance of multiciliated cells, and at stage 26 (tailbud), when the ciliated epidermis is fully developed. miR-449a, miR-449b and miR-449c (collectively named miR-449), constitute by far the most strongly induced microRNAs during epithelium differentiation in both species. Although representing less than 0.01% of all microRNA sequences in proliferating HAECs, miR-449 accounted for more than 8% of the microRNA reads in

¹CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, F06560 Sophia Antipolis, France. ²University of Nice-Sophia-Antipolis, F06560 Sophia Antipolis, France. ³CNRS, Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy, F13288 Marseille, France. ⁴University of Méditerranée, F13288 Marseille, France. ⁵INSERM, U903, F51092 Reims, France. ⁶University of Reims Champagne-Ardenne, F51092 Reims, France. ⁷INSERM, U876, F33076 Bordeaux, France. ⁸University of Bordeaux 2, F33076 Bordeaux, France. ⁹CHU de Nice, Service d'Hématologie-Biologie, Hôpital Pasteur, F06000 Nice, France. ¹⁰CHU de Nice, Service de Pédiatrie, Hôpital l'Archet 2, F06200 Nice, France. ¹¹These authors contributed equally to this work. ¹²Co-senior authors. ¹³Correspondence should be addressed to P.B. (e-mail: barbry@ipmc.cnrs.fr)

Received 20 December 2010; accepted 24 March 2011; published online 22 May 2011; DOI: 10.1038/nbc2241

LETTERS

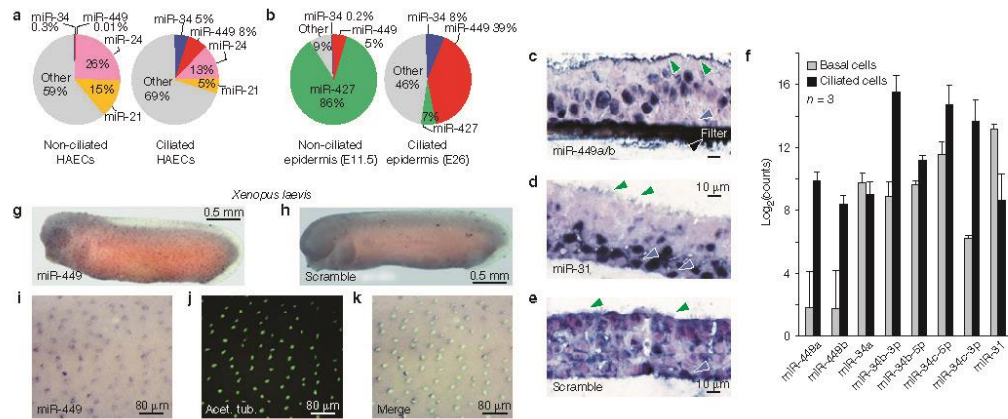


Figure 1 miR-449 microRNAs are the most upregulated microRNAs during multiciliogenesis. (a, b) Pie charts illustrating the relative microRNA abundance (percentage of microRNA reads) in undifferentiated (non-ciliated; ALI-D0) versus differentiated (ciliated; ALI-D21) HAEC cultures (a) and in *Xenopus* epidermal explants from embryos before (E11.5) and after (E26) the onset of multiciliogenesis (b; see also Supplementary Fig. S1). The miR-449 and miR-34 families are indicated in red and blue, respectively. Data are from HTS ($n=3$ donors). Similar results were obtained with microarrays ($n=3$ donors; Supplementary Fig. S1f). (c–k) Specific localization of miR-449 in multiciliated cells. *In situ* hybridization was carried out on frozen sections of 21-day ALI cultures (c–e) or from tailbud embryos of *Xenopus* (g–k) with digoxigenin-labelled LNA probes against miR-449 (c, g, i, k), miR-31 (d) and scrambled probes as a negative control (e, h). *In situ* hybridization results are representative of three individual experiments. In human (c–e), cross-sections of a well-differentiated pseudostratified epithelium revealed layers of nuclei located at different heights: a first layer is near the permeable support

and corresponds to basal cells. This layer was miR-31-positive (d). A second layer is located in the middle of the section, and corresponds to columnar cells. It was miR-449-positive (c). Cilia of multiciliated cells are indicated on the panels by green arrowheads, basal cells by blue arrowheads, and no mucus-secreting cells are morphologically detectable in those images (c–e). The dark zone at the base of the tissue indicated by a black arrowhead in c corresponds to the filter used to culture HAECs. Multiciliated cells in *Xenopus* embryos were identified by acetylated-tubulin immunostaining (j, k). (f) HTS expression profiling of miR-449, miR-34 and miR-31 expression levels in FACS-sorted human airway epithelial basal and columnar multiciliated cells (expressed as $\log_2(\text{counts})$). Data are means \pm s.d. from three independent experiments. Human airway epithelial basal and columnar ciliated cells were FACS-sorted using two specific markers of the basal cells (CD151 and tissue factor)²⁰. We collected $2.87 \pm 0.76 \times 10^6$ CD151⁺/TF⁺ cells (basal cells, at a purity of $97.1 \pm 2.3\%$) and $0.19 \pm 0.05 \times 10^6$ CD151[−]/TF[−] cells (columnar cells, at a purity of $92.4 \pm 3.3\%$).

differentiated HAECs (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1c,d). Similarly, *Xenopus laevis* miR-449a robustly increased over differentiation, representing up to 39% of all microRNA sequences in ciliated epidermal explants (Fig. 1b and Supplementary Fig. S1e). Consistent observations were made in microarray analyses and quantitative PCR assays (see Methods and Supplementary Fig. S1f,g). miR-34 family members were also induced during differentiation in both models (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1c–g), although to a lesser extent than miR-449. Interestingly, miR-449 and miR-34 belong to a superfamily of microRNAs sharing a significant identity, including in the ‘seed’ region that plays a crucial role in target recognition^{13,14}. The miR-449 family seems to be conserved through vertebrates: examination of loci syntenic to *Cdc20b* (which hosts the miR-449 cluster in human and frog) revealed the existence of miR-449 in all of the completely assembled and in some of the preliminarily assembled or partially sequenced vertebrate genomes that we examined using *in silico* approaches^{15,16} (Supplementary Fig. S2 and Table S1).

Differentiated HAECs and frog ciliated epidermis are constituted of different cell types, including mucus-secreting cells and multiciliated cells, as well as basal cells in HAECs and ionocytes in *Xenopus*⁴. Multiciliogenesis sequentially involves permanent exit from the cell cycle; centriogenesis, characterized by the production of hundreds of basal bodies, made up from neo-synthesized centrioles; and basal body migration to the apical membrane, where they act as microtubule-

organizing centres and allow the assembly of motile axonemes^{15,17–19}. Several lines of evidence indicate that in both species, miR-449 microRNAs are significantly enriched in multiciliated cells. First, *in situ* hybridization of HAEC primary cultures (Fig. 1c–e) and of human bronchial tissue (Fig. 2a–c) detected miR-449 mainly in columnar multiciliated cells but not in basal cells (Fig. 1c), or in muc5AC-positive secretory cells (Fig. 2a). Second, miR-449 microRNAs were preferentially detected in β 4-tubulin-positive multiciliated cells in cytopins of HAECs ($P < 0.001$; Fig. 2d–g). Third, immunostaining experiments revealed that CDC20B (cell division cycle 20 homologue B), the protein encoded by the host gene of miR-449, co-localized with centrin-2, a marker of basal bodies in multiciliated cells, but not with muc5AC, a marker of goblet cells (Fig. 2h–m). Fourth, microRNA profiling of columnar cells (mainly composed of multiciliated cells and few mucus-secreting cells) and of basal cells obtained after fluorescence-activated cell sorting (FACS) of HAECs (ref. 20) showed that miR-449 expression was more than two orders of magnitude higher in multiciliated cells than in basal cells, whereas the opposite distribution was observed for miR-31 (Fig. 1f). Fifth, in *Xenopus* embryonic epidermis (Fig. 1g–k) and nephrostomes (Supplementary Fig. S3b), miR-449 expression was also prominent in multiciliated cells that were positive for acetylated tubulin. Epidermal miR-449 was first detected in a ‘salt and pepper’ pattern at the early neurula stage, indicating that miR-449 microRNAs accumulate in ciliated

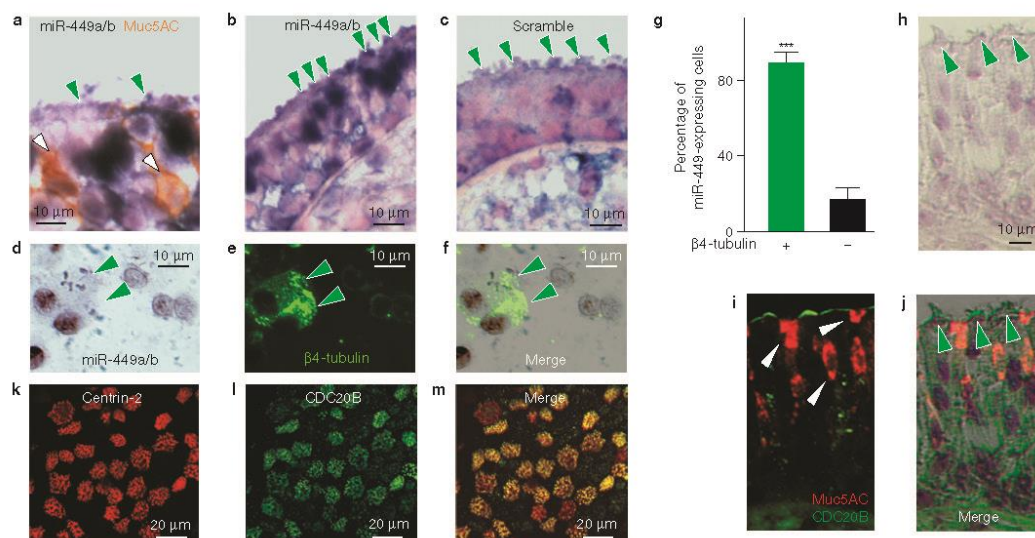


Figure 2 miR-449 and CDC20B are localized in multiciliated cells of human airway epithelium. (a–c) *In situ* hybridization on frozen sections from human bronchial tissue sections using a digoxigenin-labelled LNA probe against miR-449a/b (a,b) or a scrambled probe as a negative control (c). Green arrowheads indicate multiciliated cells. White arrowheads indicate mucus-secreting cells labelled using anti-Muc5AC antibodies. (d–f) *In situ* hybridization on cytopins of freshly isolated HAEs ($n=3$ donors) using a digoxigenin-labelled LNA probe against miR-449a/b (d,f), and anti- β -tubulin antibody to label multiciliated cells (green; e,f). Green arrowheads indicate multiciliated cells. (g) Cells stained as in d–f were assessed for miR-449a/b staining. Multiciliated cells were significantly positive for miR-449a/b (***, $P < 0.001$, Student's

t -test; 15 fields per slide, three slides per donor, $n=3$ donors). Data are means \pm s.e.m. (h–m) Immunocytochemistry experiments were carried out on human bronchial tissue sections (h–j) or on primary cultures of differentiated HAEs at ALI-D21 ($n=3$ donors; k–m). (i,j,l,m) CDC20B antibody was used to identify cells expressing miR-449 (green), which is located in intron 2 of the *Cdc20b* gene. CDC20B co-localized with multiciliated cells (multiciliated cells indicated by green arrowheads in h,j) and by centrin-2 staining for basal bodies in k,m), whereas CDC20B did not co-localize with muc5AC-positive cells (red in i and indicated by white arrowheads). Gene expression studies have revealed that in HAEs the miR-449/*cdc20b* locus delivers, in a coordinated manner, *cdc20b* transcripts and miR-449 copies.

cell progenitors (CCPs) before the onset of terminal differentiation (Supplementary Fig. S3a). Collectively, our data reveal a robust enrichment of miR-449 expression in vertebrate multiciliated cells.

To investigate the function of miR-449 in multiciliogenesis, six independent HAE cultures were transfected with a cholesterol-conjugated antagomiR directed against miR-449a/b (AntagomiR-449a/b) and ciliogenesis was assessed over the time course of regeneration. The antagomiR specifically knocked down miR-449 expression (Fig. 3b) and led to a significant reduction in the number of β 4-tubulin-positive cells at ALI-D21 (average of ciliogenesis inhibition: 2.3 ± 0.3 -fold, $n=6$, $P < 0.001$; Fig. 3a). We also knocked down miR-449 in *Xenopus* embryos by epidermal injection of a cocktail of morpholino antisense oligonucleotides targeting mature miR-449a/b/c. miR-449 morpholino oligonucleotides strongly repressed multiciliogenesis, as revealed by acetylated-tubulin staining at tailbud and tadpole stages ($n=112$; Fig. 3g–i and Supplementary Fig. S4a,b). Multiciliogenesis was also impaired in nephrostomes after miR-449 knockdown (Supplementary Fig. S3c,d). Although miR-449 depletion in *Xenopus* embryonic epidermis inhibited multiciliogenesis, it did not suppress the expression of genes encoding ciliated cell markers, such as α -tubulin, *Tex15* (testis expressed 15) and the forkhead transcription factor gene *Foxj1* (Fig. 3c–f and Supplementary Fig. S4a–c), and did not prevent intercalation of CCPs in the

outer epidermal layer (Supplementary Fig. S4b). This indicates that miR-449 microRNAs are required for terminal differentiation, but not for specification, of *Xenopus* CCPs. miR-449 inhibition apparently did not affect cell viability in HAEs nor in frog embryos (Supplementary Fig. S4d,e). In both HAEs and *Xenopus* embryonic epidermis, miR-449 knockdown caused a concomitant reduction in the number of cells positive for both tubulin (motile cilia marker) and centrin-2 (basal body marker), indicating that miR-449 microRNAs are required for multiciliogenesis at an early stage of differentiation, before centriogenesis (Supplementary Fig. S5). Our data establish miR-449 microRNAs as key regulators of multiciliogenesis in vertebrates.

Next we investigated how miR-449 microRNAs affect multiciliogenesis. We reasoned that *ad hoc* targets of miR-449 should be downregulated during terminal differentiation and after transfection of miR-449. To define miR-449 targets, we analysed the following transcriptional profiles: four time points of HAE differentiation (ALI-D0, ALI-D7, ALI-D14, ALI-D21) as well as that of proliferating HAEs transfected with miR-449. Functional annotation of differentially expressed mRNAs with gene set enrichment analysis revealed a significant enrichment in genes associated with G2/M checkpoint regulation and ciliogenesis (Supplementary Fig. S6a). miR-449-modulated transcripts were then analysed with several microRNA target prediction tools²¹,

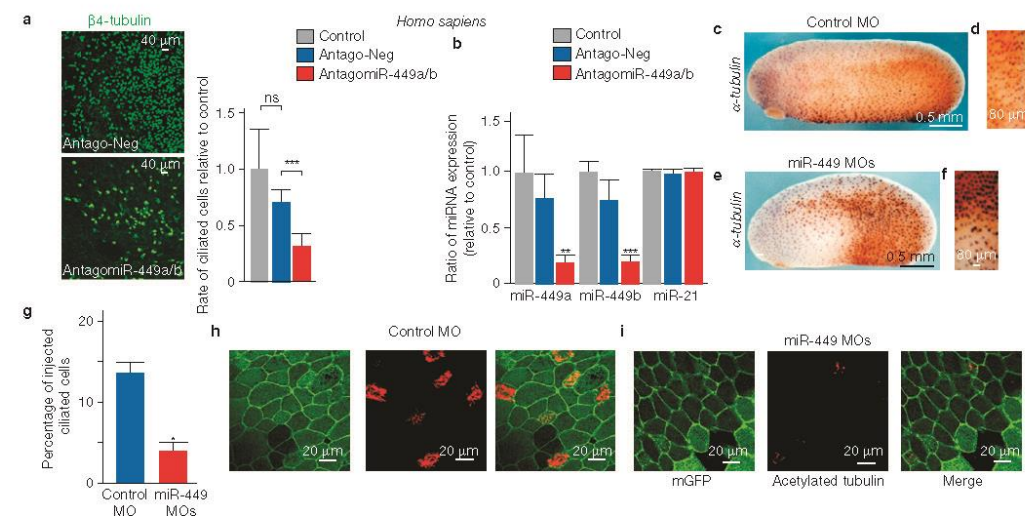


Figure 3 miR-449 knockdown inhibits multiciliogenesis. **(a,b)** HAECs ($n = 6$ donors) were chronically treated with anti-miR-449a/b or control antagomiR (20nM) during the time of differentiation, typically for 21 days at an air-liquid interface. **(a)** Typical $\beta 4$ -tubulin immunostaining of HAECs treated with a negative control antagomiR (Antago-Neg) and an anti-miR-449a/b antagomiR (AntagomiR-449a/b). The relative ratio of multiciliated cells was defined as the ratio of the number of $\beta 4$ -tubulin-positive cells to the number of nuclei (20 fields per filter, and 3 inserts per donor, $n = 6$ donors). The histogram indicates the relative ratio of multiciliated cells per field in each experimental condition, with the control set to 1. Data are means \pm s.d. from six donors (***, $P < 0.001$, Student's t -test). **(b)** Real-time RT-PCR experiments indicate that antagomiR-449a/b inhibits miR-449a and miR-449b expression and has no effect on the unrelated microRNA miR-21. Data are means \pm s.d. from six donors (ns, not significant, **, $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t -test).

***, $P < 0.001$, Student's t -test). (c–i) *Xenopus* cleavage-stage embryos were injected in the epidermis with a mixture of 30 ng control morpholino oligonucleotides (M0s; c, d, h) or miR-449a/b/c morpholino oligonucleotides (10 ng each) and 2.5 ng of FLDx (stained in orange/brown in c–f) or 500 pg mGFP-CAAX mRNA to stain plasma membranes of injected cells (g–i). (c–f) Detection of CCPs by α -tubulin *in situ* hybridization staining. (f) The miR-449-depleted region in brown shows an excess of cells positive for α -tubulin transcript when compared with the non-injected region. (g) Percentage of injected cells (positive for mGFP green fluorescence) that develop cilia in controls (1,002 cells) and in miR-449 morphants (777 cells, $P = 0.036$, Kruskal-Wallis test). (h, i) Cilia detection in tailbud stage embryos with an antibody against acetylated tubulin. mGFP immunostaining was used to reveal plasma membranes. miR-449 morphant cells do not exhibit cilia staining.

leading to the identification of several potential targets, which we validated with a dual luciferase assay. A first group of miR-449 targets code for proteins involved in cell cycle regulation (amphiregulin²², cyclin B1, cyclin E2, and cell division cycle 25 homologue A) that were partially reported elsewhere^{23–25} (Supplementary Fig. S7a–d). This is consistent with the capacity of miR-449 to block the cell cycle in proliferating human A549 cells (Supplementary Fig. S7e). Although cell cycle exit is important for commitment towards centriogenesis, a lack of miR-449 in confluent HAEcs was not sufficient to restart the cell cycle (not shown). This indicates that once the differentiation program has started, the influence of miR-449 on cell cycle regulation is marginal. We then identified and validated a second group of miR-449 targets associated with proliferation/differentiation, which includes NOTCH1 and its ligand DLL1 (Fig. 4a,b and Supplementary Fig. S7a,b). This prompted us to further examine the role of miR-449-mediated modulation of the Notch pathway in multiciliogenesis. *Dll1* and *Notch1* 3'-untranslated regions (3'-UTRs) contain miR-449-binding sites that are conserved between frog and human (Supplementary Fig. S6b). Mutation of one out of two predicted miR-449-binding sites in the human *Notch1* 3'-UTR, or of two out of three sites in the human *Dll1* 3'-UTR, was sufficient to abrogate the effects of miR-449 in luciferase assays (Fig. 4a). These data indicate that

both *Dll1* and *Notch1* are *bona fide* targets of miR-449. Next, we examined whether endogenous NOTCH1 and DLL1 in HAECs are also targeted by miR-449. DNA microarrays, real-time PCR with reverse transcription (RT-PCR) and western blot experiments revealed that miR-449 overexpression reduced the expression of both DLL1 and NOTCH1 in proliferating HAECs (Fig. 4b and Supplementary Fig. S7b), and that miR-449 invalidation increased the expression of both DLL1 and NOTCH1 in differentiating HAECs (Fig. 4b). Consistent with silencing of *Dll1* and *Notch1* expression by miR-449, we detected low levels of both DLL1 and NOTCH1 proteins in multiciliated cells when compared with undifferentiated (data not shown) or with non-ciliated differentiated cells (Fig. 4c–e). Finally, the functional impact of Notch pathway repression by miR-449 was assessed in HAECs through a target protection assay²⁶ with a cholesterol-conjugated modified oligonucleotide complementary to the conserved miR-449-binding site in the 3'-UTR of human *Notch1*. This protector oligonucleotide strongly repressed the effect of miR-449 in *Notch1* 3'-UTR luciferase assays, and caused an increase in both the *Notch1* transcript level and the number of NOTCH1-positive cells in HAECs (Supplementary Fig. S7f–h). Importantly, *Notch1* protection led to a significant reduction in the number of multiciliated cells, thus phenocopying miR-449 knockdown (Fig. 4f). Conversely,

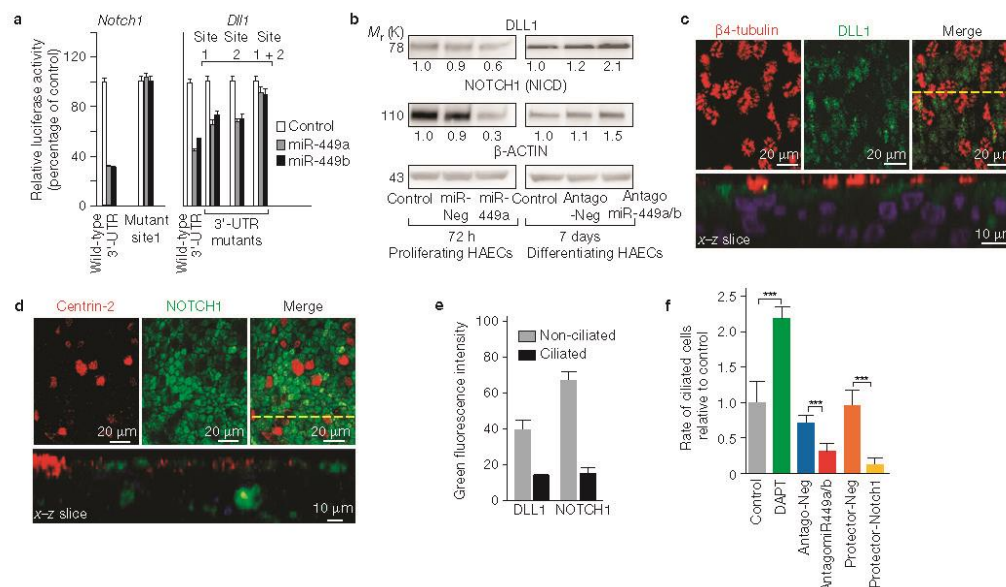


Figure 4 miR-449 microRNAs repress the Notch pathway in HAECs. **(a)** Modulation of the activity of luciferase reporters containing wild-type or mutant 3'-UTRs of human *Dll1* or *Notch1* by miR-449a/b. All experiments were done in triplicate; $n = 12$ for wild type and $n = 6$ for the mutants. Values were normalized with the internal *Renilla* luciferase control. Error bars denote s.d. **(b)** Modulation of DLL1 and NOTCH1 protein levels by miR-449 overexpression or knockdown with an antagomiR in proliferating and differentiating HAECs. Protein levels were normalized with an antibody against β -actin as an internal control and normalized fold changes are indicated beneath the corresponding bands. Experiments were representative of two donors. **(c, d)** In ALI-D21 HAECs, DLL1 and NOTCH1 proteins (in green) were detected primarily in non-ciliated cells as revealed by labelling

with β 4-tubulin and centrin-2 antibodies, respectively (in red). **(e)** Green fluorescence intensity from experiments performed as in **c, d** was quantified by confocal microscopy, thus revealing lower levels of DLL1 and NOTCH1 proteins in multiciliated cells. Data are means \pm s.d. from five independent experiments. **(f)** HAECs were chronically treated with antagomiR-449a/b, antago-Neg, Notch1 protector or negative protector oligonucleotides (20 nM) or DAPT (10 μ M) for 21 days. The histogram indicates the relative rate of multiciliated cells per field in each experimental condition, with the control set to 1. Data are means \pm s.d. $n = 18, 6, 18, 18, 6$ and 6 for control, DAPT, antago-Neg, antago449a/b, protector-Neg, protector-Notch1, respectively. (***, $P < 0.001$, Student's *t*-test). Uncropped images of blots are shown in Supplementary Fig. S9.

blockade of Notch signalling with a gamma secretase antagonist (DAPT) significantly potentiated multiciliogenesis during HAEC differentiation^{27,28} (Fig. 4f). Together, our data indicate that direct repression of the Notch pathway by miR-449 is important for multiciliogenesis in HAECs.

In *Xenopus* epidermis, *Dll1* transcripts are initially present in CCPs, which is thought to permit their specification through Notch-mediated lateral inhibition²⁹. However, *Dll1* transcripts are rapidly cleared at the early neurula stage²⁹, when miR-449 microRNAs become detectable in CCPs. Consistently, we found that inhibition of miR-449 markedly increased the endogenous level of *Dll1* transcripts at the early neurula stage (Fig. 5a). In contrast, we failed to observe any upregulation of *Notch1* transcripts in miR-449 morphant epidermis (data not shown). We thus tested the consequences of sustained DLL1 activity on multiciliogenesis. Injection of a synthetic *Dll1* mRNA devoid of miR-449-binding sites resulted in excessive specification of CCPs (Supplementary Fig. S8a; see also ref. 29), combined with deficient multiciliogenesis (Fig. 5b,c). These effects are identical to those caused by miR-449 depletion (Figs 3g–i and 5b,c). In the converse assay, knockdown of endogenous DLL1 by a translation-blocking morpholino oligonucleotide caused excessive

CCP specification but also robust multiciliogenesis (Fig. 5b,c and Supplementary Fig. S8a). Furthermore, the deficient multiciliogenesis caused by miR-449 knockdown was efficiently rescued by silencing *Dll1* (Fig. 5b,c). The widespread derepression of *Dll1* in miR-449-deficient embryos may cause Notch activation across the epidermis, leading to suppression of multiciliogenesis. Consistent with this notion, a morpholino oligonucleotide blocking translation of NOTCH1 also restored multiciliogenesis in miR-449 morphant embryos (Fig. 5b,c and Supplementary Fig. S8a). Finally, two morpholino oligonucleotides complementary to the conserved miR-449-binding sites in the 3'-UTR of *Dll1* (P1P2 morpholino oligonucleotide) were injected to protect *Dll1* from miR-449 binding. As expected, P1P2 protector morpholino oligonucleotides upregulated endogenous *Dll1* transcripts (Supplementary Fig. S8a). Strikingly, these protector morpholino oligonucleotides suppressed multiciliogenesis, but not ciliated cell specification, similarly to miR-449 knockdown and *Dll1* overexpression (Fig. 5b,c and Supplementary Fig. S8a). Our results demonstrate that miR-449-mediated repression of *Dll1* transcripts plays a key role in promoting multiciliogenesis in frog epidermis.

Intriguingly, miR-449 silencing and *Dll1* protection caused enhanced *Dll1* expression in most cells of the epidermis, and increased CCP

LETTERS

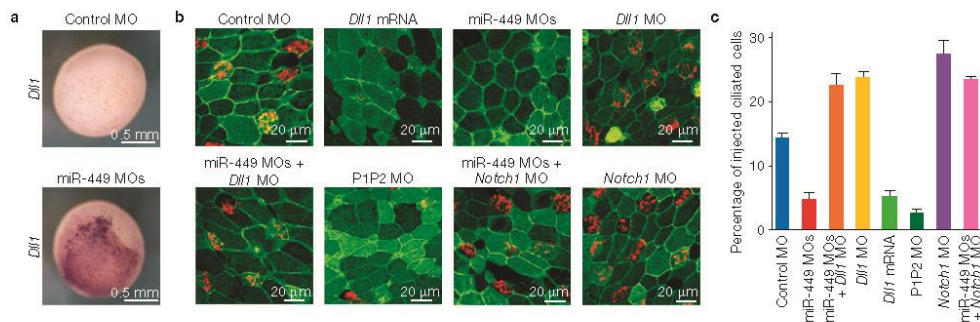


Figure 5 miR-449 microRNAs repress the Notch pathway in *Xenopus* embryonic epidermis. (a) Cleavage-stage embryos were injected in the epidermis with a mixture of anti-miR-449 morpholino oligonucleotides (MOs). *In situ* hybridization staining reveals sustained *Dll1* expression in miR-449-deficient epidermis at early neurula stage 14, although the strength and penetrance of this effect was variable between experiments. (b) Cleavage-stage embryos were injected in the epidermis with control (50 ng), miR-449 (3 × 10 ng), *Notch1* (20 ng) or *Dll1* (20 ng) morpholino oligonucleotides, *Dll1* mRNA (800 pg) or two morpholino oligonucleotides complementary to the miR-449 target sites in the 3'-UTR of *Dll1* (P1P2 morpholino oligonucleotides, 20 ng each), as indicated. In all cases mGFP-CAAX mRNA was co-injected as a lineage tracer. Co-injection of both miR-449 and *Notch1* morpholino oligonucleotides or miR-449 and

Dll1 morpholino oligonucleotides was also carried out, as indicated. Cilia are stained with an anti-acetylated-tubulin antibody (in red) and plasma membranes of injected cells are revealed by immunostaining against mGFP-CAAX. Note that *Dll1* mRNA injection suppressed ciliogenesis, although it increased the number of CCPs (Supplementary Fig. S8a). In contrast, both *Dll1* and *Notch1* knockdown enhanced ciliogenesis and rescued it in miR-449 morphants. (c) Quantification of the number of injected multiciliated cells (acetylated-tubulin positive cells) in each condition (several hundred cells were scored in each condition). $n = 777$, 535, 493, 916, 854, 690, 557 and 706 for control MO, miR-449 MOs, miR-449 MOs + *Dll1* MO, *Dll1* MO, *Dll1* mRNA, P1P2 MO, *NOTCH1* MO, miR-449 MOs + *NOTCH1* MO, respectively. Error bars correspond to s.d.

specification. This may reflect widespread basal levels of expression of both *Dll1* and miR-449 that would be below the threshold of detection in physiological conditions, as predicted by the lateral inhibition model³⁰. Alternatively, miR-449 knockdown and the associated rise in *Dll1* expression in CCPs may trigger increased *Dll1* expression in other cell types.

We found no evidence of a role for miR-449 in motile monociliated cells. Such cells are in charge of generating directional fluid flow and left/right asymmetry from midline structures of vertebrate embryos, including the gastrocoele roof plate in *Xenopus*³¹. No miR-449 expression could be detected in the gastrocoele roof plate and its knockdown did not impair left/right asymmetry (Supplementary Fig. S8b).

This and previous works indicate that activation of the Notch pathway represses multiciliogenesis in mammalian and frog mucociliary epithelia^{27–29}. Here, we show that miR-449 expression is induced during multiciliogenesis and that miR-449-mediated inhibition of the Notch pathway is required for multiciliogenesis in our two models. miR-449 microRNAs target both *DLL1* and *NOTCH1* in HAECs, but only *DLL1* in frog epidermis. We suggest that this difference is due to the different distribution of *DLL1* in the two types of epithelium. *DLL1* and *NOTCH1* are present in proliferating HAECs, whereas they are both silenced in multiciliated HAECs through the action of miR-449. However, the levels of *DLL1* and *NOTCH1* expression remain high in surrounding cells (Fig. 4c–e). Consequently, CCPs are exposed to *DLL1* from their neighbours and *Notch1* clearance by miR-449 is necessary to prevent Notch pathway activation and authorize multiciliogenesis. In *Xenopus* epidermis, CCPs are the main source of *DLL1* (ref. 29). *DLL1* clearance by miR-449 in CCPs is probably sufficient by itself to repress Notch signalling throughout the epidermis, thus bypassing the need for *Notch1* targeting. Two other mechanisms could explain why *Dll1* downregulation in CCPs is

necessary to stimulate multiciliogenesis in *Xenopus*. First, *DLL1* may repress differentiation of CCPs through autocrine signalling. Second, *DLL1* may activate Notch signalling in cells adjacent to CCPs, which in turn may produce a paracrine signal repressing CCP differentiation. Finally, we note that the expression of miR-449 remains elevated in differentiated cells, indicating that miR-449 microRNAs also play a role in maintaining the multiciliated phenotype.

Our work establishes the miR-449 family as an evolutionarily conserved key regulator of vertebrate multiciliogenesis. miR-449 microRNAs promote centriogenesis and contribute to terminal differentiation of multiciliated cells, by targeting both the cell cycle and the Delta/Notch pathway. Our study clearly illustrates that the development of multiciliated cells in the cellular environment of distinct tissues in distant animals involves common molecular networks. By providing new insights into the mechanisms controlling multiciliogenesis, our study may also pave the way for developing new therapeutic strategies aimed at treating pathologies associated with motile ciliary defects. □

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturecellbiology>

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNRS, INSERM, Région Champagne-Ardenne, Région PACA, CG05 and by grants from ANR, Vaincre la Mucoviscidose, ARC and INCa. We thank V. Magnone, G. Rios, S. Fourré, K. LeBrigand and J. Maurizio, from the IBISA Functional Genomics Platform, S. Antipolis, for help with transcriptome analyses and bioinformatics, F. Brau and J. Cazareth, for cellular imaging, V. Thomé for *in situ* hybridization experiments, F. Aguilu for artwork and B. Mari for discussions. This work is the object of a CNRS patent N°09/03723.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.M. led the project. P. Barbry, the Principal Investigator (IPMC), initiated and managed the entire project. L.K. is the Principal Investigator (IBDML) of the *Xenopus* section. B.M., L.K. and P. Barbry planned experiments, analysed and interpreted data and wrote the paper. B.M. and B. Chevalier carried out cell culture, cellular and molecular biology and cellular imaging in human, C.C., B.N.-R. and T.J. carried out *in situ* hybridization experiments, cell culture and cell sorting on human tissues, G.L., M.C. and L.K. carried out *Xenopus* experiments, K.R.-S. contributed to bioinformatics analyses, L.-E.Z. and R.W. carried out HTS experiments, R.W. helped with manuscript correction, B. Cardinaud helped with molecular cloning, C.M. carried out Affymetrix transcriptome experiments and L.G.-C. helped with PCR experiments. P. Birembaut provided critical discussion.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology>

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints>

1. Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 880–893 (2007).
2. Shah, A. S. *et al.* Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* **325**, 1131–1134 (2009).
3. Wanner, A., Salathe, M. & O'Riordan, T. G. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1868–1902 (1996).
4. Hayes, J. M. *et al.* Identification of novel ciliogenesis factors using a new *in vivo* model for mucociliary epithelial development. *Dev. Biol.* **312**, 115–130 (2007).
5. Satir, P., Mitchell, D. R. & Jekely, G. How did the cilium evolve? *Curr. Top. Dev. Biol.* **85**, 63–82 (2008).
6. Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C. & Kintner, C. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **40**, 1454–1460 (2008).
7. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–355 (2004).
8. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14 (2008).
9. Ortholan, C. *et al.* MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1047–1061 (2009).
10. LeSimple, P. *et al.* Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **36**, 296–303 (2007).
11. Marcet, B. *et al.* Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Cell. Physiol.* **211**, 716–727 (2007).
12. Coraux, C., Roux, J., Jolly, T. & Birembaut, P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**, 689–694 (2008).
13. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
14. Cardinaud, B. *et al.* miR-34b/miR-34c: a regulator of TCL1 expression in 11q-chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia* **23**, 2174–2177 (2009).
15. Flicek, P. *et al.* Ensembl 2008. *Nucleic Acids. Res.* **36**, D707 (2008).
16. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. MEGA4: molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599 (2007).
17. Dawe, H. R., Farr, H. & Gull, K. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell. Sci.* **120**, 7–15 (2007).
18. Pearson, C. G., Culver, B. P. & Winey, M. Centrioles want to move out and make cilia. *Dev. Cell.* **13**, 319–321 (2007).
19. Vladar, E. K. & Stearns, T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **178**, 31–42 (2007).
20. Hajj, R. *et al.* Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem. Cells* **25**, 139–148 (2007).
21. Le Brigand, K., Robbe-Sermesant, K., Mari, B. & Barbry, P. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* **26**, 3131–3132 (2010).
22. Zhen, G. *et al.* IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **36**, 244–53 (2007).
23. Feng, M. & Yu, Q. miR-449 regulates CDK-Rb-E2F1 through an auto-regulatory feedback circuit. *Cell Cycle* **9**, 213–214 (2010).
24. Lize, M., Pilarski, S. & Döbelstein, M. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell. Death. Differ.* **17**, 452–458 (2009).
25. Yang, X. *et al.* miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes Dev.* **23**, 2388–2393 (2009).
26. Choi, W. Y., Giraldez, A. J. & Schier, A. F. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* **318**, 271–274 (2007).
27. Tsao, P. N. *et al.* Notch signalling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development* **136**, 2297–2307 (2009).
28. Guseh, J. S. *et al.* Notch signalling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development* **136**, 1751–1759 (2009).
29. Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. & Kintner, C. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* **126**, 4715–4728 (1999).
30. Marnellos, G., Deblandre, G. A., Mjolsness, E. & Kintner, C. Delta-Notch lateral inhibitory patterning in the emergence of ciliated cells in *Xenopus*: experimental observations and a gene network model. *Pac. Symp. Biocomput.* 329–340 (2000).
31. Essner, J. J. *et al.* Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* **418**, 37–38 (2002).

METHODS

Subjects/tissue samples. Inferior turbinates or nasal polyps were from patients who underwent surgical intervention for nasal obstruction or septoplasty (provided by L. Castillo, Pasteur Hospital, Nice, France; T. Nasser, Courlancy Clinic, Reims, France; and C. Ruaux, La Sagesse Hospital, Rennes, France). The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the French Public Health Code and written consent from the patients.

Isolation, culture and sorting of HAEs. Primary HAEs were cultured according to refs 10,11. Experiments were conducted on cultures with transepithelial electrical resistance above $500 \Omega \text{ cm}^{-2}$. DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenyl)-L-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester) was used (10 μM , incubated from ALI-D0 until terminal differentiation) to inhibit the Notch pathway, when indicated. For cell sorting (three donors), we used the human-specific basal cell markers tetraspanin CD151 and tissue factor to separate basal cells from columnar cells with a FACSaria cell sorter (BD Biosciences), as described previously²⁰.

Xenopus injections. Eggs obtained from NASCO females were fertilized *in vitro*, dejellied, cultured and injected as described²¹. Capped *Dll1* (ref. 29) and *centrin-2-mGFP* (ref. 33) cRNAs were generated with the Ambion mMessage Machine kit. pCS105-mGFP-CAAX (a gift from C. Chang, University of Alabama at Birmingham, USA) was linearized with *AscI* and cRNA was synthesized with Sp6 polymerase. Fixable fluorescent lysine dextran (FLDX, 2.5 ng per cell) was co-injected with morpholino oligonucleotides to sort injected embryos, and anti-fluorescein immunodetection was carried out to trace the distribution of morpholino oligonucleotides in fixed embryos. All injections were done at least twice.

Immunohistochemistry. Frozen sections or fresh cultures of ALI-D21 HAEs or bronchial tissue sections were used for detection of β -4-tubulin, cytokeratin-13, Muc5AC, CDC20B and nuclei as described previously^{10,20}. We also used anti-centrin-2 mouse monoclonal antibody (clone (N-17)-R; 1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-CDC20B mouse monoclonal antibody (clone 2F2; 1:400, Sigma) and rabbit polyclonal antibodies to DLL1 or mouse monoclonal anti-NOTCH1 (clone A6; 1:200, Abcam). *Xenopus* multiciliated cells were stained with anti-acetylated tubulin monoclonal antibody (clone 6-11B-1; 1:200, Sigma). To reveal the mGFP-CAAX, we used a rabbit anti-mGFP antibody (1:400; Torrey Pines Biolabs) together with a secondary antibody coupled to Alexa 488 (Molecular Probes). Secondary antibodies were used at 1:200 or 1:500 according to the experiments.

Western blot and ELISA measurement. Preparation of HAE protein lysate (3 donors) was carried out using RIPA buffer (Thermo Scientific Pierce) and western blotting using NuPage Novex Bis Tris MiniGels (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Revelation was carried out with Immobilon ECL (Millipore); gel images were acquired using a Fujifilm LAS-3000 imager. In addition to the antibodies mentioned above, we used anti-CCNE2 (1:200, a gift from G. Ponzio, INSERM U 634, UFR Médecine, Nice, France), rabbit polyclonal anti-NOTCH1 (1:500, Abcam) and anti- β -actin antibodies (1:1,000, 1-19, Santa Cruz Biotechnology).

Apical and basolateral supernatants of untreated, miR-Neg- or miR-449a-treated HAEs (two donors) were taken after 48 h of treatment. Released amphiregulin (AREG) was then measured using a DuoSet ELISA kit (R&D systems) following the manufacturer's instructions.

Total RNA extraction. HAEs (a total of 16 donors) were lysed in TRIzol reagent (Invitrogen). *Xenopus* ectoderm explants were prepared at late blastula stage, cultured in $1 \times \text{MBS}$ (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.7 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 5 mM HEPES at pH 7.8 and 2.5 mM NaHCO_3) and collected for RNA extraction at gastrula stage 11.5 and tailbud stage 26. *Xenopus* total RNAs were purified with a Qiagen RNeasy kit (Qiagen). The integrity of RNA was evaluated using RNA nano-chips (Agilent Technologies).

microRNA HTS and microarray experiments. Total RNAs were isolated from ALI cultures (three donors) or sorted HAEs (three donors) and from stage 11.5 (gastrula) and stage 26 (tailbud) epidermal explants of *Xenopus* embryos (pool of $n = 50$ explants of each stage). Small RNA libraries were generated from total RNA (300 ng) with the SOLiD Small RNA Expression Kit (SREK, Applied Biosystems) and sequenced on the Applied Biosystems SOLiD System following the manufacturer's instructions. Reads ($5\text{--}20 \times 10^5$ per sample) were matched to both known microRNA precursors and to the human or *Xenopus tropicalis* genome using the Applied Biosystems RNA2map software. All table results were submitted to GEO (GSE22147). Parameters for the *Xenopus* analysis took into account the fact that the list of microRNA precursors was from *Xenopus tropicalis* rather than from *Xenopus laevis*.

MicroRNA profiling was carried out using microarrays (Human microRNA Microarray v2, containing 866 human and 89 human viral microRNAs, Sanger microRNABase v.12.0, Agilent Technologies), according to the supplier prescription.

mRNA expression profiling was carried out with DNA GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix), according to the manufacturer's instructions. Data were processed using RMA (Robust Multi-Chip Average)²⁴.

All data were stored on microarray information system Mediant²⁵, and analysed with Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Results have been submitted to GEO (accession number GSE22147) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE22147>).

Quantitative RT-PCR. Real-time PCR was carried out using a TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) on a Lightcycler 480 (Roche), according to the manufacturer's instructions. The expression levels of mature microRNAs were calculated using the 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ method, using RNU44 and RNU6B as endogenous controls.

In situ hybridization. After fixation in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences), frozen sections of ALI-D21 cultures or of human airway tissues were acetylated, and incubated overnight at 55°C with $0.3 \text{ ng} \mu\text{l}^{-1}$ locked nucleic acid (LNA) digoxigenin-labelled microRNA probes (Exiqon) in 50% deionized formamide, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl at pH 8.0, 5 mM EDTA, 10 mM NaPO_4 at pH 8.0, 10% dextran sulphate, $1 \times$ Denhardt's solution and 0.5 mg ml^{-1} yeast RNA. The probes were: miR-449, 5'-ccagctaacatcacatgcc-3'; miR-31, 5'-acgtatgcagctatctgctt-3'; scramble microRNAs, 5'-ggttaacagctctatagccca-3'. Probes were revealed by sequential incubations with horseradish-peroxidase-conjugated sheep anti-digoxigenin antibodies (Roche), the Tyramide Signal Amplification Plus DNP AP System (Perkin-Elmer) and BCIP/NBT substrate (DakoCytomation). Some slides were then exposed to mouse anti-Muc5AC antibodies and revealed with the LSAB2 System-HRP kit (Dako). Sections were counterstained with Nuclear Fast Red eosin/safran, and mounted using Eukitt mounting medium (Electron Microscopy Sciences).

Isolated HAEs from three donors (5×10^4 cells per slide in $100 \mu\text{l}$ PBS) were centrifuged (55g, 10 min) using cytospin 2 (Shandon). Slides were air-dried (1 h), fixed in cold-methanol plus acetone (10 min), air-dried again and stored at -80°C . *In situ* hybridization and immunocytochemistry were then carried out as before to visualize and quantify cells co-expressing miR-449 and β -4-tubulin.

In *Xenopus*, we used an anti-miR-449a mono-digoxigenin-labelled LNA probe (Exiqon). *In situ* hybridization was done as described previously³³. Antisense riboprobes for α -tubulin²⁹, *Dll1* (ref. 29), *Tex15* (ref. 36) and *Pax1* (ref. 37) were prepared as described in the respective references.

miR-449 and target gene knockdown experiments. HAEs. 3'-cholesterol-linked 2'-O-methyl miR-449a/b antisense oligonucleotide (antagomiR), 5'-a,c,c,g,c,u,a,c,a,a,c,a,c,g,c,c,a-Chol-3' and Notch1 protector oligonucleotide 5'-a,a,a,a,g,g,c,a,g,u,u,u,c,u,g,u,a-Chol-3' (phosphorothioate bonds are indicated by subscript s) were purchased from Eurogentec. miR-449 antagomiR targets *Homo sapiens* miR-449a (full match) and miR-449b with one mismatch. The Notch1 protector is a complementary antisense oligonucleotide targeting the conserved miR-449-binding site of the human *Notch1* 3'-UTR. The negative control was the Clear-miR (5'-c,a,u,c,g,c,a,u,g,c,g,c,a-Chol-3') from Eurogentec. AntagomiR or antisense protector (100 μM) was pre-incubated with fetal calf serum (FCS) for 30 min at room temperature. Then, the antagomiR/FCS or Notch1 protector/FCS mixture in differentiation medium (20 μM) was added to the apical side of primary HAEs. After 2 h at 37°C , the apical medium was removed to restore the air-liquid interface. Transfection was repeated every 5 days with freshly prepared antagomiR or antisense protector, until control cells reached full differentiation (typically after 21 days).

Xenopus embryos. Morpholino oligonucleotides against miR-449 (GeneTools, LLC) were antisense to *Xenopus tropicalis* miR-449: miR-449a morpholino oligonucleotide, 5'-ACCAGCTAACATTACACTGCCT-3'; miR-449b morpholino oligonucleotide, 5'-GCCAGCTAAACTACACTGCCT-3'; miR-449c morpholino oligonucleotide, 5'-ACAGCCAGCTAGCAAGTGCACTGCC-3'; morpholino oligonucleotide control, 5'-TGCACGTTTCAATACAGACCGT-3'. We used previously reported morpholino oligonucleotides against *Dll1* (ref. 38) and *Notch1* (ref. 39). The protector morpholino oligonucleotides directed against miR-449-binding sites in *Dll1* 3'-UTR have the following sequences: P1 morpholino oligonucleotide, 5'-CGGCAGTGCAACAGTTTATGTCTGG-3'; P2 morpholino oligonucleotide, 5'-AGGCAGTGACTGTCTGTAGTTTACG-3'.

Ectopic expression of microRNAs in HAEs. HAEs (four donors) were grown to 30% confluency in proliferation medium. Cells were then transfected with microRNAs (10 nM) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen), and RNA was extracted 48 h later.

Cell cycle analysis by flow cytometry. A549 lung adenocarcinoma cells, grown in DMEM supplemented with L-glutamine and 10% FCS at 30% confluency, were first synchronized by overnight serum starvation and transfected with microRNAs. Cells were collected 48 h later, fixed with 80% ethanol and stained (37 °C, 30 min) with 0.1 ml propidium iodide solution (50 µg ml⁻¹) containing RNase A (50 µg ml⁻¹). Data were acquired on a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson). Percentages of cells in G1, S and G2+M were calculated using CellQuest Pro software.

Viability and apoptosis measurements. HAECs (two donors in triplicate) were chronically treated with antagomiR (20 µM) as before and viability was measured 24 h, 14 days and 21 days later using a resazurin-based *in vitro* toxicology assay kit (Sigma), following the manufacturer's instructions.

In *Xenopus*, apoptosis was evaluated through terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling. Briefly, fixed embryos were incubated with TdT enzyme (Invitrogen) and digoxigenin-labelled ddUTP nucleotides (Roche) to label DNA fragments in apoptotic cells. Digoxigenin-labelled molecules were then immunodetected with an anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase and staining was done with NBT/BCIP substrate.

Plasmid constructs and luciferase measurements. Complete or partial sequences from the wild-type or mutant 3'-UTRs of *Areg*, *Ccni1*, *Ccne2*, *Cdc25a*, *Dhl1* and *Notch1* were amplified and cloned into psiCheck2 vector (Promega). For mutated 3'-UTRs, three bases of each seed region were changed by complementary bases. psiCheck2 constructions were co-transfected with synthetic microRNAs or

a negative control (Ambion, Applied Biosystems) with or without antagomiRs or antisense protectors into HEK293T cells, and luciferase activities were measured as previously described⁴⁰.

32. Marchal, L., Luxard, G., Thome, V. & Kodjabachian, L. BMP inhibition initiates neural induction via FGF signalling and *Zic* genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 17437–17442 (2009).
33. Mitchell, B. *et al.* A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature* **447**, 97–101 (2007).
34. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
35. Le Brigand, K. & Barbry, P. Mediente: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* **23**, 1304–1306 (2007).
36. Kloosterman, W. P. *et al.* *In situ* detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat. Methods* **3**, 27–29 (2006).
37. Pohl, B. S. & Knochel, W. Isolation and developmental expression of *Xenopus* FoxJ1 and FoxK1. *Dev. Genes. Evol.* **214**, 200–205 (2004).
38. Morichika, K. *et al.* Perturbation of Notch/Suppressor of Hairless pathway disturbs migration of primordial germ cells in *Xenopus* embryo. *Dev. Growth. Differ.* **52**, 235–244 (2010).
39. Lopez, S. L. *et al.* Notch activates sonic hedgehog and both are involved in the specification of dorsal midline cell-fates in *Xenopus*. *Development* **130**, 2225–2238 (2003).
40. Pottier, N. *et al.* Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One* **4**, e6718 (2009).

DOI: 10.1038/ncb2241

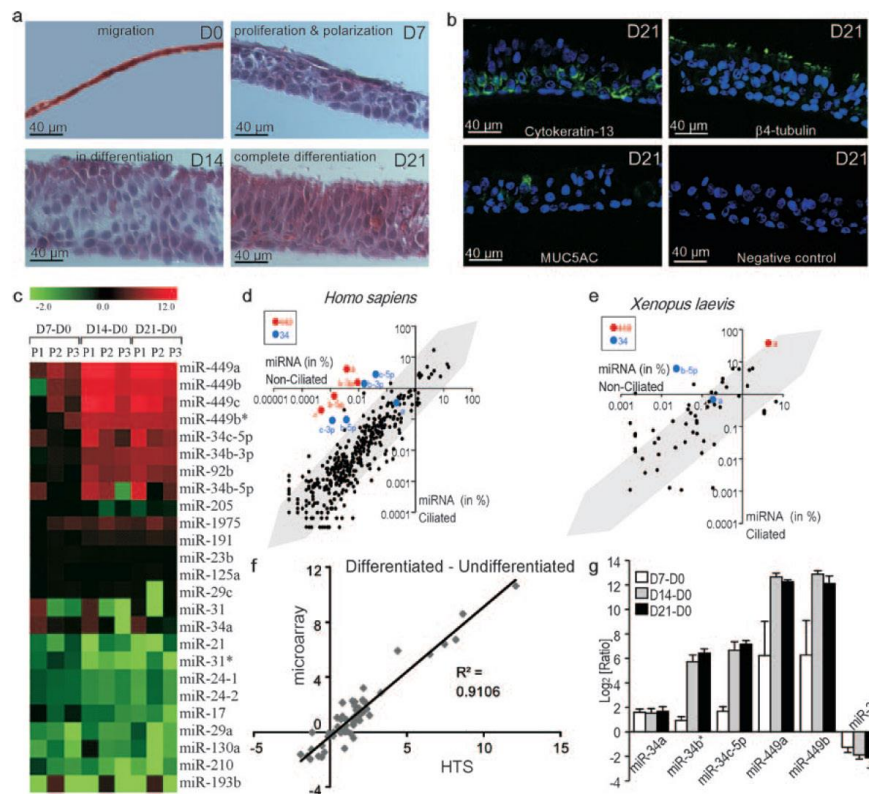


Figure S1 microRNA signature during multiciliogenesis in HAECS and *Xenopus laevis* embryonic epidermis. (a) Characterization of *in vitro* regeneration of human airway mucociliary epithelium, mainly constituted of columnar multiciliated and mucus-secreting cells and basal cells. In native upper airways, multiciliated cells typically represent ~50% of HAECS¹¹, mucus-secreting cells account for ~20% of HAECS³⁷, and basal cells represent ~30% of HAECS¹⁷. In contrast, mucus-secreting cells account for less than 1% of HAECS in primary cultures. Four typical steps of the culture are illustrated: (i) ALI-D0, monolayer of undifferentiated cells undergoing migration and proliferation; (ii) ALI-D7, transient squamous and pluristratified epithelium, starting polarization; (iii) ALI-D14, initiation of mucociliary differentiation; (iv) ALI-D21, pseudostratified well-differentiated mucociliary epithelium. (b) Immunohistochemical characterization of well-differentiated cultures (ALI-D21), containing multiciliated cells, mucus-secreting cells and basal cells, detected with antibodies against β4-tubulin, Muc5AC, and cytokeratin-13 antibodies, respectively. Nuclear labelling with DAPI (blue). (c) Heat map showing the fold-changes of microRNAs expression in HAECS at D7, D14 and D21 of air liquid interface relative to D0 (3 patients, P1-P3). miR-21 decreased from 14.7±1.7% in proliferating cells to 5.0±4.0% at the onset of multiciliogenesis. miR-191 increased from 4.35±0.85% in proliferating cells to 17.7±1%, in well-differentiated airway epithelium. miR-34a was

up-regulated during polarization but never represented more than 1% of all detected sequences. The most dramatic changes occurred for 23 microRNAs at the onset of multiciliogenesis (ALI-D14): miR-449a, miR-449b, miR-449b*, miR-449c, miR-34a, miR-34b-3p, miR-34b-5p, miR-34c-5p, miR-92b, miR-191, miR-1975, miR-125a were dramatically increased, while miR-17, miR-193b, miR-31, miR-31*, miR-130a, miR-205, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-210, miR-29a were decreased. miR-449abc, miR-34bc, and miR-92b barely detected in proliferating cells, were robustly upregulated after differentiation. MicroRNA expression appeared stable at later time points. (d, e) Scatter plots of the relative microRNAs abundance (% of total microRNAs reads) in undifferentiated (non-ciliated) (ALI-D0, x-axis) versus differentiated (multiciliated) (ALI-D21, y-axis) HAECS cultures (d) and in *Xenopus laevis* epidermal explants from embryos before (E11.5, x-axis) and after (E26, y-axis) the onset of multiciliogenesis (e). The miR-449 and miR-34 families are indicated in red and blue, respectively. Zones with <10-fold variation are shaded in grey. (f) Correlation between HTS (SOLiD, Applied Biosystems) and microarray (Agilent Technologies) data in HAECS. Log2(ratios) between differentiated and undifferentiated cells (n=3 donors) between HTS and microarray experiments were compared (coefficient of correlation $R^2 = 0.91$). (g) Real time PCR validation of miR-449, miR-34 and miR-31 in HAECS. Data are means ± s.d. from five individual experiments

SUPPLEMENTARY INFORMATION

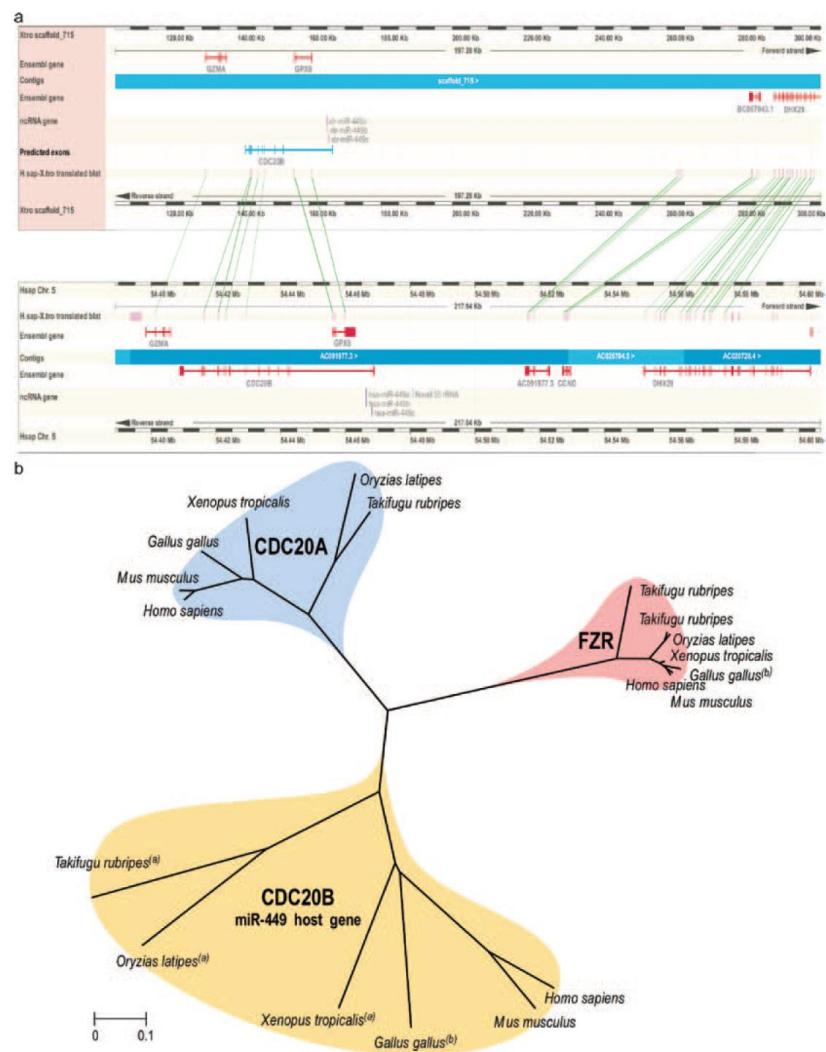


Figure S2. (a) Synteny of the miR-449 genomic region. Ensembl multi-species view of human and *Xenopus tropicalis* miR-449 genomic region³⁸. Custom data for *Xenopus tropicalis* (and not *Xenopus laevis*, which is not yet available) predicted miR-449 and predicted *Cdc20b* exons were uploaded in gff format. The representation of this region shows that gene order is conserved between human and amphibian. *Cdc20b* is located upstream to *Gzma* and downstream to *Ccno*, *Dhx29*, and an uncharacterized gene similar to *Geminin*. *Mir-449* cluster genomic location is conserved, in the second intron of *Cdc20b*, next to *Gpx8* gene located on the opposite strand. **(b)** Unrooted phylogenetic tree of the CDC20 family in vertebrates. Known protein sequences of CDC20A, CDC20B and FZR (Fuzzy related) were retrieved from Ensembl release 56. Protein sequences of CDC20B for *X. tropicalis*, *A. carolinensis*, *T. rubripes*,

O. latipes, *G. gallus* were established by a combination of tblastx analysis of each syntenic region as well as blastx analysis using the available *Cdc20b* sequences as database and Genscan analysis on the genomic sequence (after exclusion of the *Gpx8* gene region). Multiple alignments were completed using ClustalW and the unrooted tree was constructed using the Neighbor-Joining method with pairwise deletion option in MEGA 4³⁹. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing alignment gaps and missing data were eliminated in pairwise sequence comparisons. All analyzed vertebrates contain at least one member of each family, *Cdc20a*, *Cdc20b* and *Fzr*. Each *Cdc20b* gene hosts a miR-449 cluster. (a) predicted sequence (b) corrected sequence.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

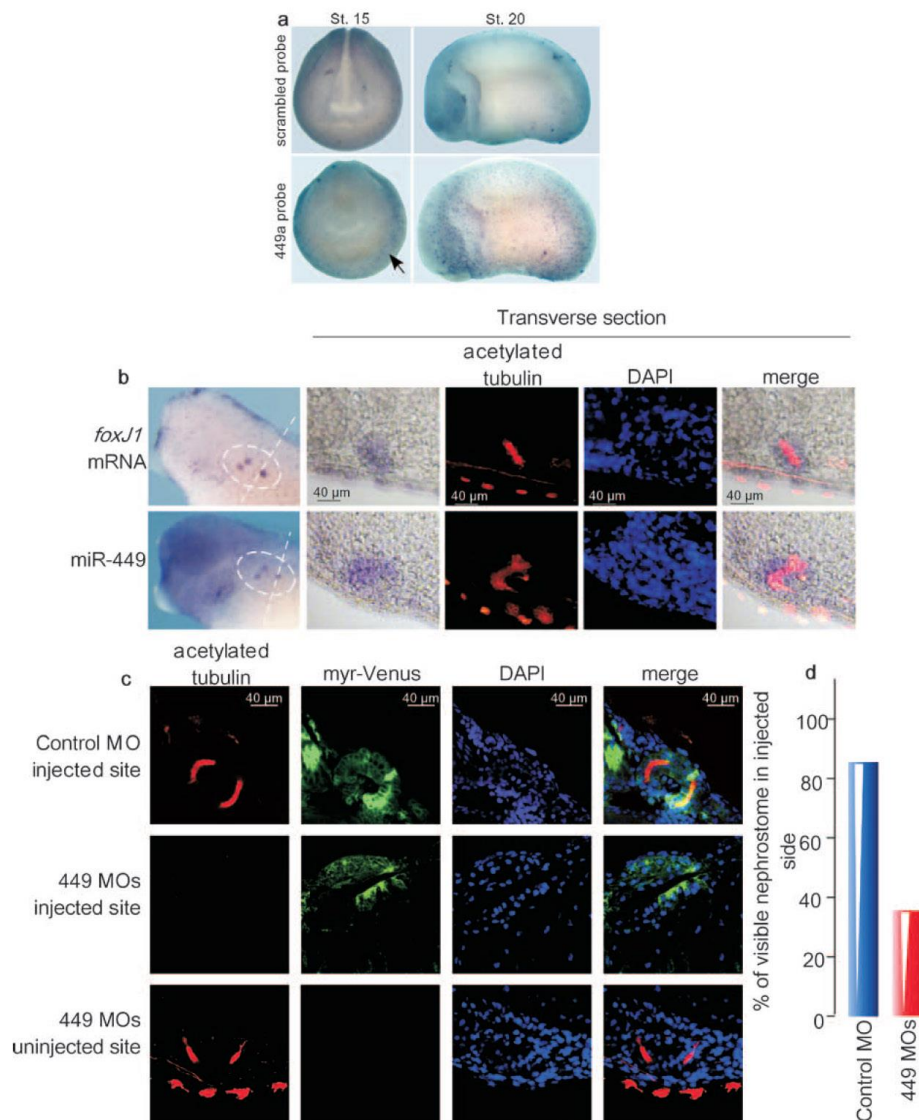


Figure S3 (a) *Xenopus* miR-449 are expressed at an early stage of differentiation. Whole-mount *ISH* was performed at open neural plate stage (st. 15) and early tailbud stage (st. 20), with a digoxigenin-labeled LNA probe against miR-449a or a scramble LNA probe, as negative control. Note that punctate staining (see Fig. 1) is visible with the anti-miR-449a/b probe at stage 15 (arrow), which is before acetylated-tubulin staining can be detected. **(b-d)** miR-449 is expressed in multiciliated cells of the nephrostomes and required for their ciliogenesis. **(b)** Comparison of *foxJ1* mRNA and miR-449 distribution in the three nephrostomes (encircled in

white) of the pronephros at tailbud stage 35. Embryos were transversally sectioned and double stained with antibodies against acetylated-tubulin to reveal cilia. Note the co-localization of *foxJ1* and miR-449 with cilia of nephrostomic cells. **(c)** 8-cell embryos were unilaterally injected in the marginal zone to target the pronephros territory with control or miR-449 MOs, together with myr-Venus mRNA as a lineage tracer. Stage 35 embryos were transversally sectioned and stained for cilia. **(d)** Quantification of the reduction in the number of ciliated nephrostomes detectable in miR-449 morphants. Quantification was done on the injected half.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

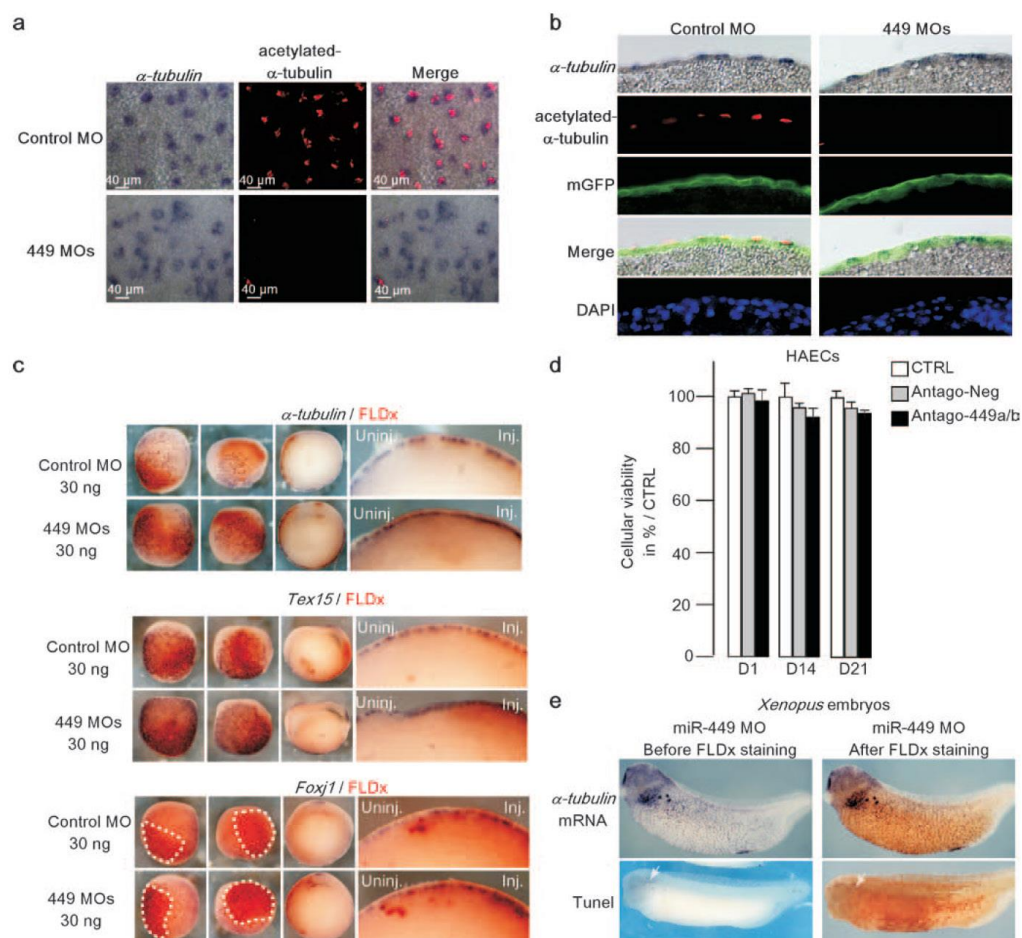


Figure S4 (a-b) miR-449 deficient cells intercalate in the superficial epidermal layer, maintain a ciliated cell progenitor identity but do not make cilia. 16-cell embryos were injected in the epidermis with miR-449 MOs or control MO, together with GFP-CAAX as a lineage tracer. Embryos were fixed at tailbud stage 25 and processed for α -tubulin ISH and acetylated-tubulin immunostaining. (a) Whole embryos were photographed, showing that CCPs are maintained in miR-449 deficient embryos but do not build cilia. (b) Embryos were transversally sectioned to examine the position of the α -tubulin positive cells in the epidermis. This shows that miR-449-deficient CCPs are capable of intercalating in the outer epithelial layer but do not build cilia. (c) miR-449 knock-down enhances ciliated cell specification. Cleavage stage embryos were injected in the epidermis with a mixture of anti-miR-449 MOs or control MO and FLDx, as indicated. Embryos fixed at early neurula stage were subjected to ISH with α -tubulin, *Tex15* and *Foxj1* riboprobes, followed by immunostaining to reveal the presence of FLDx in brown. Embryos were

then sectioned to better visualize the density of ciliated cell progenitors in injected domains. For all three markers, the miR-449 knockdown increased the number of CCPs. (d-e) miR-449 knockdown does not alter cell viability and does not cause apoptosis. (d) HAECS viability was measured using resazurin-based in vitro toxicology assay kit after one day (D1), 14 days (D14) or 21 days (D21) of treatment with Antago-449a/b compared to Antago-Neg and untreated cells (CTRL). Data are means \pm s.d. from six individual experiments. Treatments with antago-449a/b failed to alter cellular viability of differentiating HAECS. (e) 16-cell embryos were injected in the epidermis with miR-449 MOs and FLDx, as a lineage tracer. Embryos were fixed at tadpole stage 35 and processed for α -tubulin ISH and TUNEL staining. Embryos were photographed before and after FLDx staining in brown. miR-449 deficient cells maintain a ciliated cell progenitor identity and do not display significant tunnel staining ($n=25$). The previously described TUNEL staining in the head region at this stage (white arrow) served as control for the procedure.

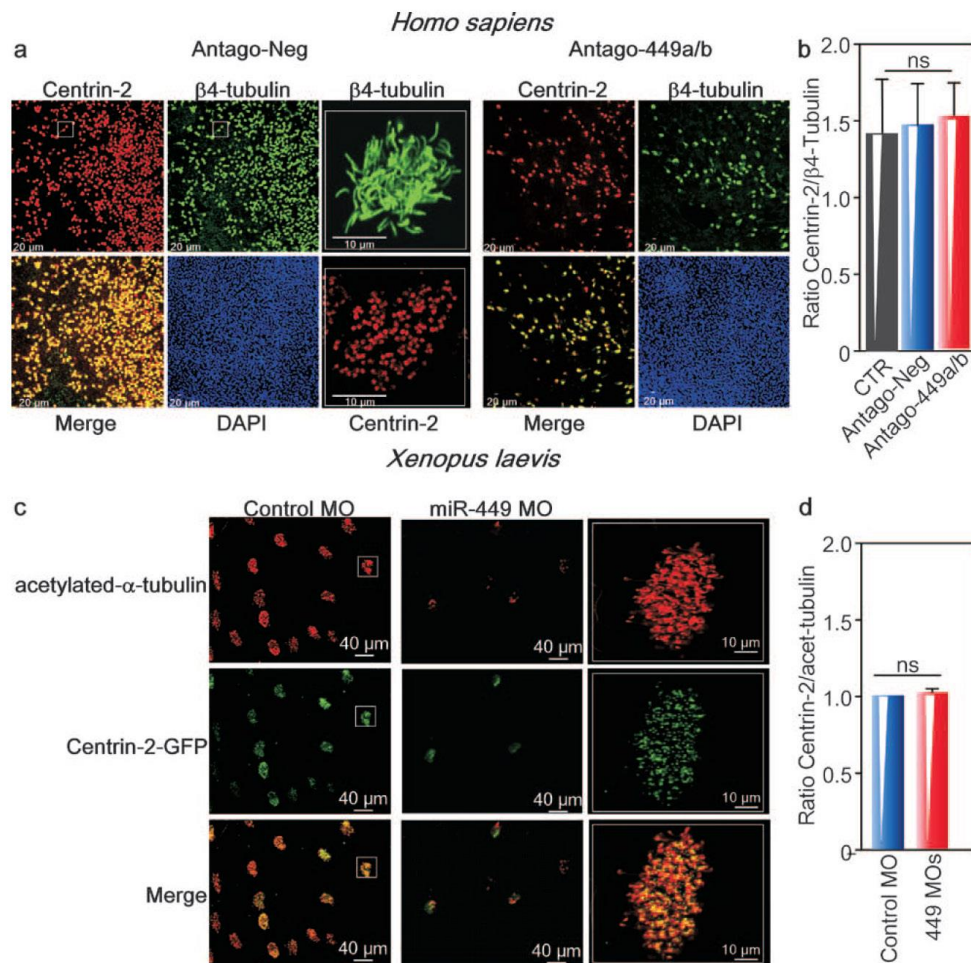


Figure S5 miR-449 knockdown suppresses centriogenesis and multiciliogenesis. (a) HAEc cultures were treated with antagomiR-449 (antago-449a/b), used to block both miR-449a and b, which were the most abundant miR-449, or negative control antagomiR (antago-Neg) during regeneration, as indicated. Cultures were fixed at ALI-D21 (terminal differentiation stage) and co-immunostained with anti-β4-tubulin and anti-centrin-2 antibodies. β4-tubulin-positive or centrin-2 positive multiciliated cells were visualized and quantified by confocal videomicroscopy with 10X objective. Multiple cilia and hundreds of basal bodies per cell were visualized using 63X objective. Note that miR-449 knock-down inhibited cilia formation and basal body multiplication in the same cells. On the contrary, control antagomiR (Antago-Neg) failed to affect centriogenesis (centrin-2 positive cells) as well as multiciliogenesis (β4-tubulin positive

cells). (b) The ratio between centrin-2 positive cells and β4-tubulin positive cells was similar among conditions, indicating that miR-449 invalidation altered both centriogenesis and multiciliogenesis. (c) 16-cell embryos were injected in the epidermis with a mixture of anti miR-449 MOs or control MO and 400 pg/cell *centrin2-GFP* mRNA, to stain basal bodies. Embryos were fixed at tailbud stage and processed for acetylated-tubulin immunostaining. Note the concomitant loss of cilia and basal body staining in miR-449 deficient embryos. (d) Similarly to HAEc, *Xenopus* miR-449 knockdown caused a parallel reduction in the number of cells positive for both tubulin and centrin-2, suggesting that miR-449 blocked multiciliogenesis at an early step by acting before centriogenesis. In control cells, multiple cilia and basal bodies were visualized using 20x objective.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

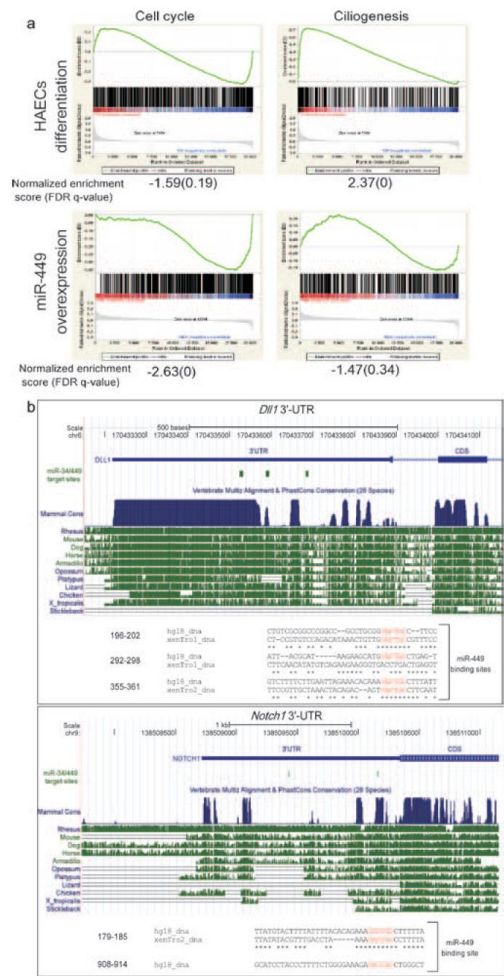


Figure S6 (a) Identification of putative miR-449 targets in HAECs. In order to define ciliogenesis-associated miR-449 targets, we characterized the transcriptional program during differentiation and after the transfection of each individual miR-449 into proliferating HAECs. Functional annotation of these experiments with Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) revealed a significant enrichment in genes related to “cell cycle” (particularly the G2/M checkpoint), and to “ciliogenesis” (including Notch signalling players). In the miR-449 overexpression condition, “cell cycle”, but not “ciliogenesis”, was significantly enriched. The 4 pictures summarize the results of a gene set enrichment analysis, as explained at <http://www.broadinstitute.org/gsea/doc/GSEAUserGuideFrame.html>. GSEA calculates an enrichment score (ES), which reflects the degree to which a gene set is overrepresented at the top or bottom of a ranked list of genes. A positive ES indicates gene set enrichment at the left of the ranked list (corresponding to an up-regulation of the gene set); a negative ES indicates gene set enrichment at the right of the ranked list (corresponding to a down-regulation of the gene set). For each panel, the top plot provides a graphical view of the enrichment score for the gene set indicated on the left. The middle portion of the plot shows where the members of the gene sets (“cell cycle” or “ciliogenesis”) appear in the ranked list of genes. The bottom portion of the plot shows the value of the ranking metric, which measures a gene’s correlation with a phenotype. A positive value indicates correlation with the first phenotype (differentiation or miR-449 over-expression) and a negative value indicates correlation with the second phenotype (non-differentiated or control). miR-449 transfection of cells grown on plastic, which cannot fully differentiate into ciliated cells, probably explains the absence of a significant enrichment for the “ciliogenesis” term. All experimental data have been stored on Gene Expression Omnibus under the accession numbers GSE22147. **(b)** Conservation of miR-449 binding sites on *Dll1*- and *Notch1*-3'-UTRs. Genomic region surrounding 3'UTR of *Dll1* and *Notch1* gene are displayed using the UCSC Genome Browser on Human March 2006 (NCBI36/hg18) Assembly (<http://genome.ucsc.edu/>). The miR-449/miR-34 target site positions in the 3' UTR of the human *Dll1* gene and *Notch1* are represented. Multiple phastCons alignments of mammalian species and pairwise alignments of each species to the human genome show conserved genomic regions. For each target site position in the 3'UTR, the human genomic region sequence is displayed. When conserved, *Xenopus tropicalis* genomic region is aligned to the human target site region.

appear in the ranked list of genes. The bottom portion of the plot shows the value of the ranking metric, which measures a gene’s correlation with a phenotype. A positive value indicates correlation with the first phenotype (differentiation or miR-449 over-expression) and a negative value indicates correlation with the second phenotype (non-differentiated or control). miR-449 transfection of cells grown on plastic, which cannot fully differentiate into ciliated cells, probably explains the absence of a significant enrichment for the “ciliogenesis” term. All experimental data have been stored on Gene Expression Omnibus under the accession numbers GSE22147. **(b)** Conservation of miR-449 binding sites on *Dll1*- and *Notch1*-3'-UTRs. Genomic region surrounding 3'UTR of *Dll1* and *Notch1* gene are displayed using the UCSC Genome Browser on Human March 2006 (NCBI36/hg18) Assembly (<http://genome.ucsc.edu/>). The miR-449/miR-34 target site positions in the 3' UTR of the human *Dll1* gene and *Notch1* are represented. Multiple phastCons alignments of mammalian species and pairwise alignments of each species to the human genome show conserved genomic regions. For each target site position in the 3'UTR, the human genomic region sequence is displayed. When conserved, *Xenopus tropicalis* genomic region is aligned to the human target site region.

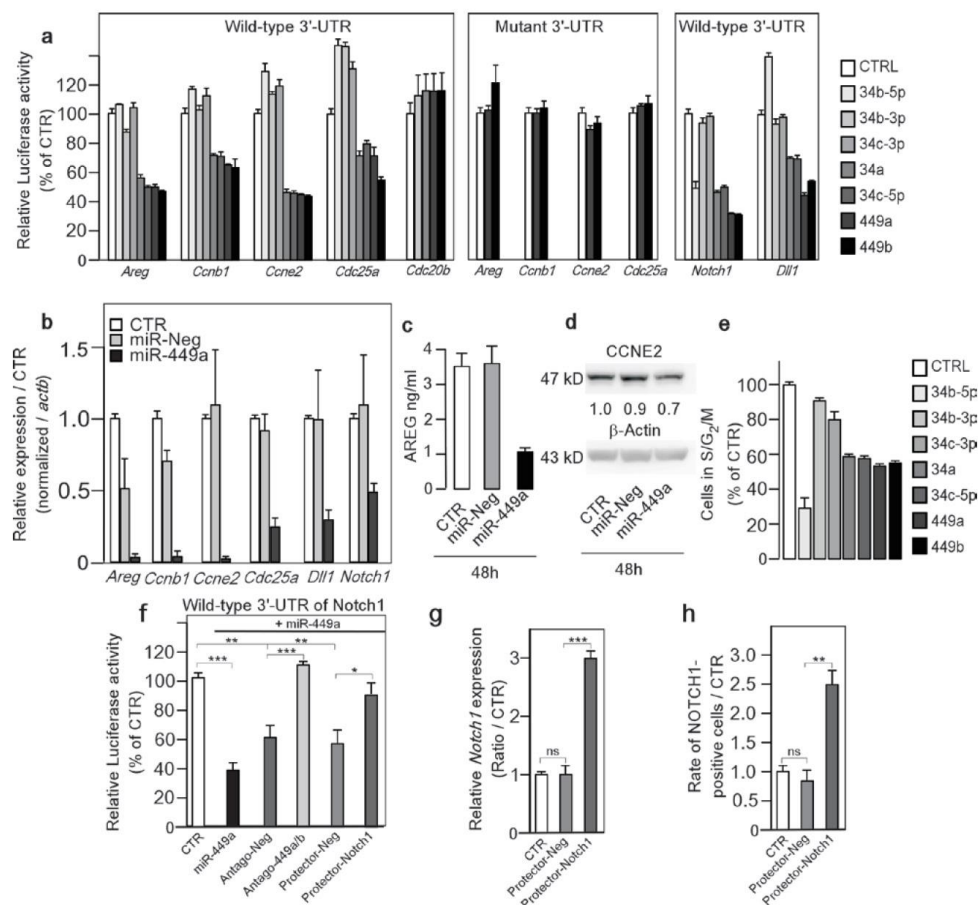


Figure S7 Repression by miR-449 of molecules related to cell cycle and to the Notch pathway. (a) A first group of validated miR-449a/b targets code for cell cycle-related proteins¹⁹, *Amphiregulin* (*Areg*), an EGF receptor ligand, *Ccnb1*, *Ccne2*, and *Cdc25a*. A second group of targets code for NOTCH1 and its ligand *DLL1* (see Fig. 4). Specific interaction between miR-449 or miR-34 and their 3'-UTRs was confirmed using luciferase reporter assay on constructs carrying either the wild-type or mutants 3'-UTR-binding site of miR-449, miR-34a, miR-34c-5p, miR-449a and miR-449b, sharing the same binding site region, reduced relative luciferase activity of wild-type 3'-UTR chimeric constructs with *Areg*, *Ccnb1*, *Ccne2* and *Cdc25a*. Those effects were abolished on the corresponding mutated 3'-UTR chimeric constructs. Values were normalized to the internal *Renilla* Luciferase control (n=5 independent experiments). miR-449 exert no regulation on its host gene *Cdc20b*. (b) miR-449 overexpression in proliferating HAEs strongly reduced *Areg*, *Ccnb1*, *Ccne2*, *Cdc25a*, *Dll1* and *Notch1* transcript levels in comparison to miR-Neg and untreated (CTR) conditions using real-time RT-PCR. Transcript levels were normalized using β -actin gene (*actb*) (n=3 measurements on two donors). (c) Inhibition of AREG release in proliferating HAEs by miR-449 overexpression (ELISA). AREG participates through EGF

pathway to the induction of a mucus-producing airway epithelium⁴⁰ (n=3 measurements on two donors). (d) Inhibition of CCNE2 expression after miR-449 overexpression in proliferating HAEs (n=2 donors). (e) Cell cycle arrest in the G1 phase after transfection of A549 with synthetic miR-449 (n=3 measurements on two donors). (f) Antago-449a/b and *Notch1* protector oligonucleotide specifically prevent miR-449 binding on *Notch1* 3'-UTR. miR-449a transfection in HEK293 cells strongly reduced relative luciferase activity of wild-type 3'-UTR chimeric constructs of *Notch1*. This effect was strongly blocked by antago-449a/b or *Notch1* protector co-transfection, whereas it was not significantly affected by co-transfection with negative controls (antago-Neg or protector-Neg). Values were normalized to the internal *Renilla* Luciferase control. (g-h) Validation of *Notch1* protection in HAEs. Chronic treatment of HAEs with *Notch1* protector oligonucleotide (20 nM) significantly increased *Notch1* transcript level in comparison to negative protector and untreated (CTR) conditions, as revealed by real-time RT-PCR (g), as well as the number of Notch1-positive HAEs relative to control (h). Transcript levels were normalized using *actb*. Error bars denotes standard deviation from five individual experiments (***, P<0.001; **, P<0.01; *, P<0.05, Student's *t*-test).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

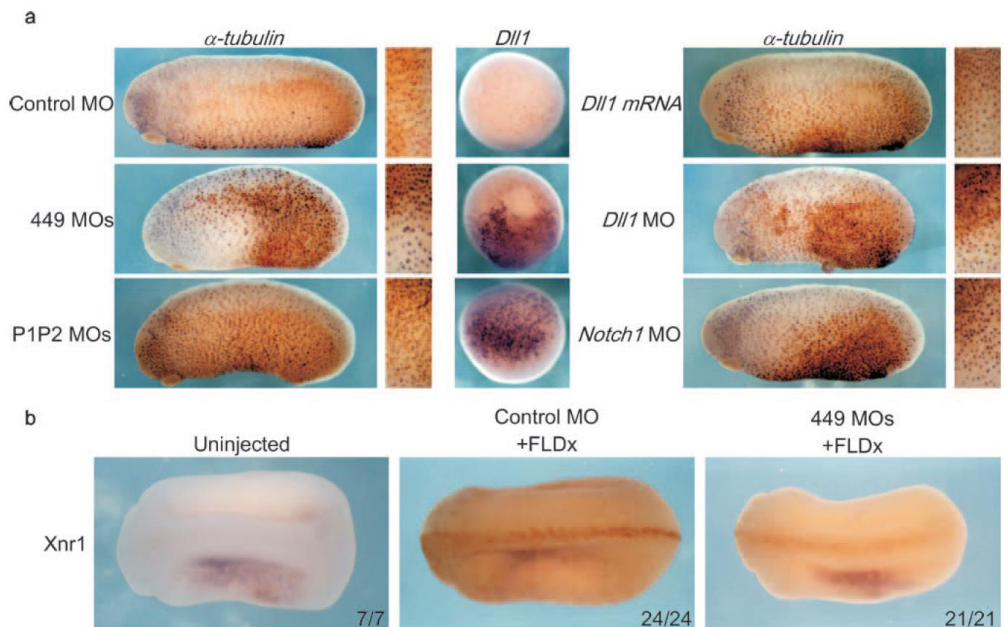


Figure S8 (a) Notch pathway modulation does not prevent ciliated cell specification. Cleavage stage embryos were injected in the epidermis with a mixture of anti miR-449 MOs, control MO, *Dll1* mRNA, *Dll1* MO, *Notch1* MO or *Dll1* protector P1P2 MOs, together with FLDx to trace injected cells. Note that in all cases, the density of ciliated cell progenitors marked by α -tubulin expression was increased in injected domains, indicating that cell specification is not blocked by any of these treatments. The excess number of ciliated cell progenitors can be explained by reduced lateral inhibition in the case of *Dll1* and *Notch1* MOs and by Notch cis-inhibition in cells exposed to injected *Dll1* mRNA or P1P2 MOs. This effect had been reported in Deblandre *et al*²⁵. The expression of *Dll1* was also analysed in embryos injected with control, miR-449 and P1P2 MOs. Note that the

lack of interaction between miR-449 and *Dll1* 3'-UTR caused the up-regulation of *Dll1* transcripts. **(b)** miR-449 knockdown does not affect left/right asymmetry. 4-cell embryos were injected with control or miR-449 MOs, together with FLDx (in brown) as a lineage tracer, in the marginal zone of the two dorsal cells. The targeted region gives rise to the gastroscoele roof plate, a territory covered with motile monociliated cells that is responsible to establish left/right asymmetry. *Xnr1* (the *Xenopus* counterpart to mammalian *nodal*) mRNA expression (revealed in blue), which is normally restricted to the left lateral plate mesoderm of tailbud embryos, is maintained in its normal site in miR-449 morphants (embryos are in dorsal view). The number of embryos showing normal *Xnr1* unilateral expression over the total number of embryos analysed is indicated (3 independent experiments).

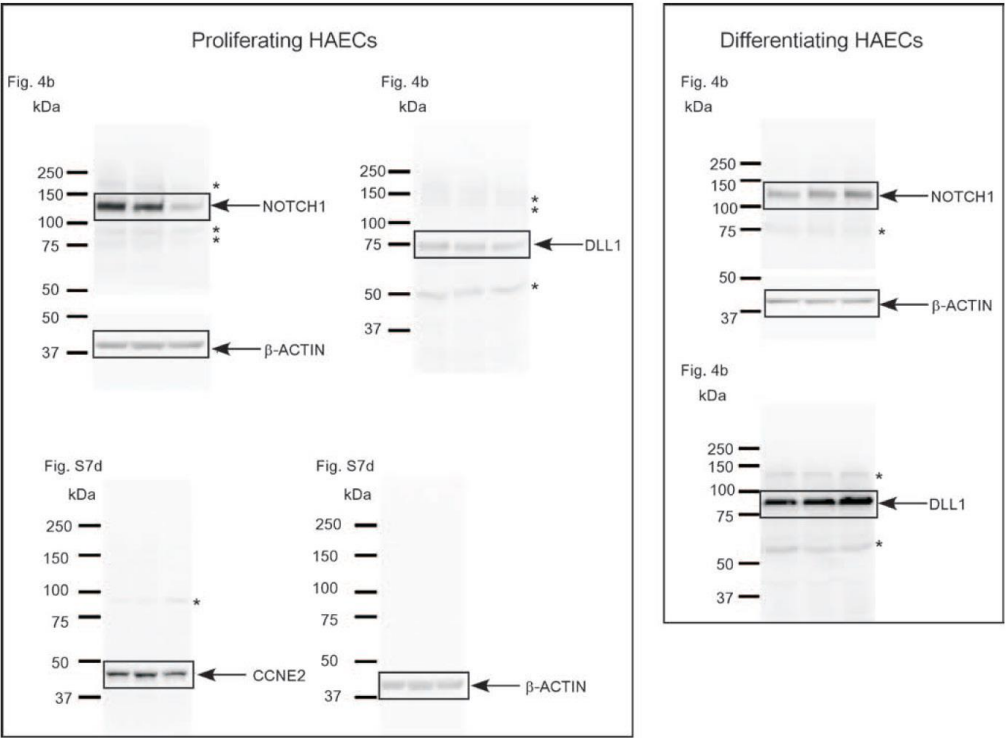


Figure S9 Full scans of western data. *Non-specific bands.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1 Predicted members of the miRs-449 family. MicroRNAs located in syntenic region of *Cdc20b*. Sequence upstream to *Gpx8* gene was analyzed for the presence of the conserved seed sequence. The folded precursor structure was computed using the RNAfold program from the ViennaRNA suite. The stem-loop coordinates were retrieved using Ensembl Blat. (1) *Cdc20b* gene prediction. (2) Non-complete microRNAs stem-loop. Note that *Xenopus laevis* miR-449a shares an identical sequence with *Xenopus tropicalis*, as revealed by HTS experiments.

Species		ID	Status	Reference	Genome	Genomic coordinates	Host gene	
Human	<i>Homo sapiens</i>	hsa-mir-449a	miRbase	MI0001648	GRCh37	5,544,663,60-5,544,664,50 [-]	CDC20B	
		hsa-mir-449b	miRbase	MI0003673	GRCh37	5,544,664,74-5,544,665,70 [-]		
		hsa-mir-449c	miRbase	MI0003823	GRCh37	5,544,680,90-5,544,681,81 [-]		
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	ptr-mir-449a	miRbase	MI0008670	PanTro2.1	5,607,841,05-6,075,841,94 [+]	CDC20B	
		ptr-mir-449b	miRbase	MI0008671	PanTro2.1	5,607,839,85-6,075,840,80 [+]		
		ptr-mir-449c	Predicted		PanTro2.1	5,607,823,69-6,075,824,72 [+]		
Macaque	<i>Macaca mulatta</i>	mmi-mir-449a	miRbase	MI0007747	MMUL1.0	6,528,156,40-6,528,157,30 [-]	CDC20B	
		mmi-mir-449b	miRbase	MI0007748	MMUL1.0	6,528,157,54-6,528,158,50 [-]		
		mmi-mir-449c	NA ^a		MMUL1.0	6,528,177,12-6,528,177,69 [-]		
Mouse	<i>Mus Musculus</i>	mmu-mir-449a	miRbase	MI0001649	NCBIM37	13,113,827,742-13,827,832 [+]	CDC20B	
		mmu-mir-449b	miRbase	MI0005547	NCBIM37	13,113,827,627-13,827,706 [+]		
		mmu-mir-449c	miRbase	MI0004645	NCBIM37	13,113,826,191-13,826,299 [+]		
Cow	<i>Bos taurus</i>	bta-mir-449a	miRbase	MI0009834	BTAL4.0	20,255,974,68-25,597,555 [+]	CDC20B	
		bta-mir-449b	miRbase	MI0009835	BTAL4.0	20,255,973,44-25,597,441 [+]		
		bta-mir-449c	miRbase	MI0009836	BTAL4.0	20,255,958,34-25,595,939 [+]		
Horse	<i>Equus caballus</i>	eca-mir-449a	miRbase	MI0012851	EquCab2	21,171,519,65-17,151,915 [+]	CDC20B	
		eca-mir-449b	Predicted		EquCab2	21,171,518,31-17,151,915 [+]		
		eca-mir-449c	Predicted		EquCab2	21,171,506,25-17,150,721 [+]		
Dog	<i>Canis familiaris</i>	cfa-mir-449a	miRbase	MI0001651	BROAD2	2,453,903,54-4,539,044 [-]	CDC20B ^(*)	
		cfa-mir-449b	Predicted		BROAD2	2,453,904,85-4,539,056 [-]		
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	rno-mir-449a	miRbase	MI0001650	RGSC3.4	2,444,182,73-4,441,836 [+]	CDC20B ^(*)	
		rno-mir-449b	Predicted		RGSC3.4	2,444,181,62-4,441,824 [+]		
		rno-mir-449c	Predicted		RGSC3.4	2,444,167,39-4,441,683 [+]		
Opussum	<i>Monodelphis domestica</i>	mbo-mir-449a	Predicted		MONDOM5	3,175,445,71-17,544,664 [-]	CDC20B ^(*)	
		mbo-mir-449b	miRbase	MI0005329	MONDOM5	3,175,456,06-17,545,684 [-]		
Platypus	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	oan-mir-449a	miRbase	MI0006793	OANAS	Contig3432: 5911-6025 [+]	CDC20B	
		oan-mir-449b	miRbase	MI0006792	OANAS	Contig3432: 5779-5880 [+]		
		oan-mir-449c	miRbase	MI0006791	OANAS	Contig3432: 4405-4521 [+]		
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	gga-mir-449a	miRbase	MI0003715	WASHUC2	Z: 160,406,13-160,406,98 [-]	CDC20B ^(*)	
		gga-mir-449b	miRbase	MI0007566	WASHUC2	Z: 160,407,63-160,408,56 [-]		
		gga-mir-449c	miRbase	MI0007445	WASHUC2	Z: 160,419,27-160,419,98 [-]		
Lizard	<i>Anolis carolinensis</i>	aca-mir-449a	Predicted		AnoCar1.0	282,108,680-108,681 [+]	CDC20B ^(*)	
		aca-mir-449b	Predicted		AnoCar1.0	282,108,614-108,623 [+]		
		aca-mir-449c	Predicted		AnoCar1.0	282,108,429-108,430 [+]		
Xenopus	<i>Xenopus tropicalis</i>	xtr-mir-449a	miRbase	MI0004967	JGI4.1	scaffold_715: 164,904-164,980 [-]	CDC20B ^(*)	
		xtr-mir-449b	Submitted	MI0018161	JGI4.1	scaffold_715: 165,047-165,132 [-]		
		xtr-mir-449c	Submitted	MI0018162	JGI4.1	scaffold_715: 165,282-165,374 [-]		
Stickleback	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	gac-mir-449f	Predicted		BROADS1	groupXIII: 224,2237-224,2322 [-]	CDC20B ^(*)	
		gac-mir-449g	Predicted		BROADS1	groupXIII: 224,1856-224,1935 [-]		
		gac-mir-449h	Predicted		BROADS1	groupXIII: 224,1934-224,1676 [-]		
Medaka	<i>Oryzias latipes</i>	ola-mir-449g	Predicted		MEDAKA1	9,453,193-453,147 [+]	CDC20B ^(*)	
		ola-mir-449h	Predicted		MEDAKA1	9,453,1529-453,1617 [+]		
Tetraodon	<i>Tetraodon nigrovindis</i>	tni-mir-449f	Predicted		TETRAODON8.0	12,564,835-564,844 [+]	CDC20B ^(*)	
		tni-mir-449g	Predicted		TETRAODON8.0	12,564,848-564,859 [+]		
		tni-mir-449h	Predicted		TETRAODON8.0	12,564,861-564,869 [+]		
Fugu	<i>Takifugu rubripes</i>	fru-mir-449g	Predicted		FUGU4	scaffold_360: 9120-9208 [-]	CDC20B ^(*)	
		fru-mir-449h	Predicted		FUGU4	scaffold_360: 8975-9057 [-]		

MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation

Brice Marcet,^{1,2,*} Benoît Chevalier,^{1,2} Christelle Coraux,^{3,4} Laurent Kodjabachian^{5,6} and Pascal Barbry^{1,2,*}

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire; UMR-6097; Sophia-Antipolis, France;

²Université de Nice-Sophia-Antipolis; Sophia-Antipolis; ³INSERM U903; ⁴Université de Reims Champagne-Ardenne; Reims, France;

⁵CNRS; Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy; ⁶Université de la Méditerranée; Marseille, France

Multiciliated cells lining the surface of some vertebrate epithelia are essential for various physiological processes, such as airway cleansing. Their apical surface is constituted by hundreds of motile cilia, which beat in a coordinated manner to generate directional fluid flow. We recently reported the identification of microRNAs of the miR-449 family as evolutionary conserved key regulators of vertebrate multiciliogenesis. This novel function of miR-449 was established using in vivo and in vitro antisense approaches in two distinct experimental models. miR-449 strongly accumulated in multiciliated cells in human airway epithelium and *Xenopus laevis* embryonic epidermis, where it triggered centriole multiplication and multiciliogenesis by directly repressing the Delta/Notch pathway. Our data complement previous reports that showed the blocking action of miR-449 on the cell cycle, and unraveled a novel conserved mechanism whereby Notch signaling must undergo microRNA-mediated inhibition to permit differentiation of ciliated cell progenitors. We review here several important questions regarding the links between microRNAs and the Notch pathway in the control of cell fate.

Introduction

Multiciliated cells lining the surface of some tissues are present in all vertebrates and exhibit at their surface hundreds of motile cilia, microtubules-containing

organelles (Fig. 1). Their coordinated beating allows efficient fluid movement, which plays an important role in physiological processes such as the evacuation by the respiratory tract of inhaled particles trapped in the mucus (mucociliary clearance), the circulation of cerebrospinal fluid or the migration of the embryo in the genital tract.¹⁻³ Dysfunctions of such cilia may contribute to worsening of respiratory, brain or reproductive symptoms in several diseases including primary ciliary dyskinesia, chronic obstructive pulmonary diseases, asthma, cystic fibrosis, hydrocephalus or infertility.^{1,3} The elucidation of mechanisms governing the synthesis of motile cilia (multiciliogenesis) is thus a fundamental question with obvious biomedical relevance.

Multiciliogenesis occurs during development or regeneration of some specialized epithelia, including mucociliary epithelia. Multiciliogenesis requires (1) exit from the cell cycle, (2) generation of hundreds of basal bodies, linked to a massive multiplication of centrioles (centriologensis), (3) migration and anchoring at the apical surface of basal bodies, where they act as microtubule organizing centers at the base of each cilium.⁴⁻⁷ The function of basal bodies as specific sites of ciliary microtubule nucleation is largely based on their organization around centrioles, barrel-shaped organelles. A centrosome is constituted by a pair of perpendicularly-arranged centrioles associated with a fibrous matrix of pericentriolar material. Centrosomes act during separation of the chromosomes in cell division, while basal

Key words: ciliogenesis, ciliated cells, motile cilia, ciliopathies, respiratory diseases, microRNAs, miR-449, miR-34, xenopus epidermis, airway, mucociliary epithelium

Submitted: 06/21/11

Revised: 07/11/11

Accepted: 07/12/11

DOI: 10.4161/cc.10.17.17011

*Correspondence to: Brice Marcet and Pascal Barbry;
Email: marcet@ipmc.cnrs.fr
and barbry@ipmc.cnrs.fr

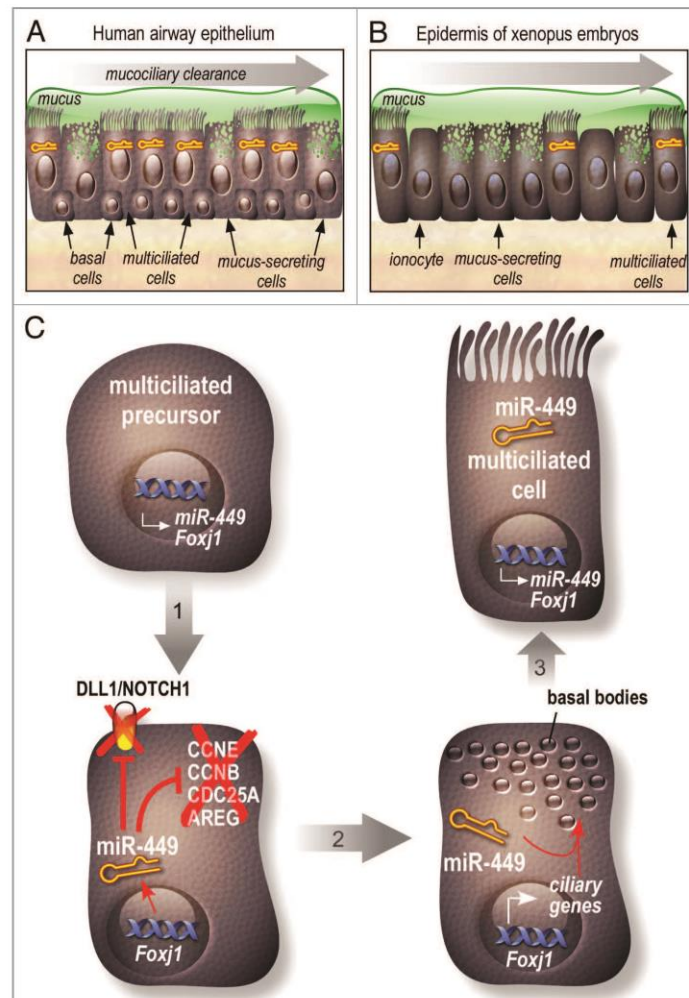


Figure 1. (A and B) Specific expression of miR-449 in multiciliated cells. Mucociliary epithelia such as human airway epithelium (A) or the embryonic *Xenopus* epidermis (B) consist of mucus-secreting cells and multiciliated cells. The airway epithelium also contains basal cells, which could serve as a reservoir of progenitors for repair. The *Xenopus* epidermis also contains cells specialized in ion transport, called ionocytes. Members of miR-449 family of miRNA (yellow hairpins) are strongly enriched in multiciliated cells while their level of expression is nearly undetectable in other cell types (C). Model illustrating the role of miR-449 during multiciliogenesis. Multiciliogenesis is initiated by the acquisition of the ciliary identity. Progenitor of multiciliated cells express miR-449 and the transcription factor FOXJ1 (1). miR-449 expression induces the repression of both cell cycle components and DLL1 and/or Notch1, leading to cell cycle arrest and entry into differentiation (2). miR-449 expression promotes the multiplication of basal bodies, while FoxJ1 controls their migration and anchoring at the apical surface, where assembly of the axoneme and elongation of cilia can be initiated (3).

bodies are important to organize primary or motile cilia. Abnormal centrosome numbers is a hallmark of virtually all cancers. From that perspective, the molecular mechanisms underlying centriole

amplification during differentiation of multiciliated cells can shed some light on the mechanisms that tightly control the formation of a unique daughter centriole at each division in other cells.^{8,9} Studying

the mechanisms leading to the elaboration and maintenance of cilia may therefore have an impact on our understanding of centrosome number amplification during cancer.

The mechanisms controlling the production of multiple motile cilia remain largely unknown. Advances came from studies on the transcription factor *Foxj1*, a pivotal regulator of motile ciliogenesis, which promotes docking of basal bodies at the apical membrane.^{4,10-15} Work with mouse, *Danio rerio* and *Xenopus laevis* embryos have shown that inhibition of *Foxj1* activity caused a strong reduction of ciliogenesis, accompanied by randomization of left-right asymmetry, hydrocephalus, and the formation of kidney cysts, due to impaired fluid flow in the corresponding tissues.^{6,15-17} Promoter bashing as well as chromatin immunoprecipitation experiments have contributed to establish the direct transcriptional influence of *Foxj1* on genes encoding structural and functional components of the motile ciliary machinery. Taken together, these results show that selective activation of *Foxj1* in specific cells can bypass a default pathway generating a primary cilium at the exit of the cell cycle, and instead favor differentiation into motile cilia. However, *Foxj1* does not appear to control centriole multiplication in *Xenopus* embryos^{6,17} and in mouse respiratory epithelium.¹⁶ We hypothesized that the *Foxj1*-independent mechanism leading to the multiplication of basal bodies is, at least in part, dependent on the expression of specific microRNAs (miRNAs or miR).¹⁸

miRNAs are a class of small single-stranded and non-coding regulatory RNAs, controlling many biological processes by repressing gene expression by a post-transcriptional mechanism.¹⁹⁻²² Mature miRNAs, approximately 22 nucleotides long are usually derived from a primary transcript called pri-miRNA, through transcription by a type II RNA polymerase²³ (transcription by type III RNA polymerase has also been suggested for some miRNAs²⁴). Pri-miRNAs are cleaved into the nucleus by Microprocessor, a hetero-dimer composed of the RNase III endonuclease Droscha, and of DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)/Pasha.^{20,21,25,26} This first cleavage liberates the pre-miRNA (formed by a hairpin of about 70 nucleotides that includes an overhang of 2–3 nucleotides at the 3' end). Pre-miRNAs are then exported to the cytoplasm via exportin-5 in a Ran

GTP-dependent manner. In the cytoplasm, cleavage of each pre-miRNA near the hairpin by Dicer, a second RNase III endonuclease, generates duplexes of two short RNA sequences that exhibit two-nt single-stranded 3' overhangs at both ends: one sequence corresponds to the mature miRNA, while the second is usually degraded.^{20,25-27} Unconventional strategies of miRNAs maturation have also been reported. They are not discussed here, as excellent reviews on that topic can be found in reference 28. The final effector able to interact with the target mRNAs (mRNAs) is the RNA-induced silencing complex (RISC). Argonaute proteins form the core of RISCs.²⁸ Different members of this family display specific expression patterns, binding partners and biochemical capabilities: high throughput sequencing of RISCs has for instance shown that AGO1 displays a strong bias toward small RNAs with a 3'-U, while AGO2 and AGO4 select small RNAs with a 5'-A, and AGO5 small RNAs with a 5'-C.²⁸ Target recognition then follows a complex set of rules that is usually dominated by the existence of a perfect match between six and eight nucleotides located in the 5' region of the miRNA (called the seed) and the target mRNA.²⁹⁻³¹ Eiring and collaborators have described last year that miR-328 can regulate mRNA translation in leukemic blasts in a RISC-independent mode,³² suggesting the existence of alternative, though secondary, modes of miRNA action. RNA sequencing of RISCs complexes has also provided useful information about the interaction between the miRNA and its mRNA targets.^{33,34} It takes place within the 3'-non-coding region in 40% of the cases (especially at proximity of the stop codon or near the poly A tail³⁵), within the CDS in 25% of the cases, and within the 5'-non-coding region in 1% of the cases, the rest of the hybridizations being located within non-coding RNAs and intronic, intergenic, or other sequences.³³ Based on relative complexities of seeds and targets, each miRNA can potentially interact with hundreds of mRNAs. It is generally estimated that up to 30% of human genes could be regulated by miRNAs.³⁶ The ability of the miRNA to interact with many targets, together with the

possibility for several miRNAs to share a same target, represents a powerful mechanism to increase tremendously the complexity of biological networks. miRNA base pairing to a target mRNA can induce posttranscriptional gene repression by deadenylation,³⁷⁻⁴⁰ inhibition of translation,^{41,42} or mRNA cleavage.⁴³ In some cases, miRNA can also relocate target mRNA to cytoplasm foci called P-bodies for storage or degradation.²² A careful comparison between gene expression and proteomic measurements after overexpression of a specific miRNA has shown that most of the targets that were deregulated at the protein level were also affected at the mRNA level.⁴⁴ This observation implies that analysis at the transcript level can often be sufficient to identify relevant miRNA:mRNA complexes.⁴⁵ Several studies have described key roles of miRNAs in signal transduction,⁴⁶ lung morphogenesis⁴⁷ and some respiratory diseases like cystic fibrosis.^{20,48-50} Comparing two models of mucociliary epithelium, namely the mammalian airways and the embryonic skin of *Xenopus laevis* embryos, which both contain mucus-secreting cells and multiciliated cells⁵¹⁻⁵⁴ (Fig. 1A), we sought to identify microRNAs involved in vertebrate multiciliogenesis. This led us to identify the first functional link, conserved from amphibian to human, between the miR-449 family of miRNAs (miR-449a, miR-449b and miR-449c) and the Notch pathway during multiciliogenesis.¹⁸

The Notch pathway is highly conserved in the animal kingdom and is known to control cell fate decisions in numerous contexts. Its specific role during the development of cells with multiple motile cilia has started to be unraveled.^{18,55-57} Notch signaling is activated upon binding of the transmembrane Notch receptor to one of its ligands (Delta or Serrate).^{58,59} Ligand binding results in proteolytic cleavage of Notch, releasing an intracellular domain, which translocates to the nucleus and activate target gene transcription, thus controlling the differentiation program.^{58,59} Several studies have shown that activation of the Notch signaling pathway was incompatible with differentiation into the multiciliated phenotype.^{18,55-57}

Here, we review recent findings about the biological roles of miR-449, and

extend our discussion to additional links between miRNAs and Notch signaling.

miR-449 Strongly Expressed in Multiciliated Cells

Using high throughput sequencing, microarrays and real-time PCR our work has established miRNAs signatures during mucociliary differentiation of both human airway epithelium and *Xenopus* embryonic epidermis. The miR-449 family represents the most highly upregulated miRNAs during multiciliogenesis in both species (Fig. 1A),¹⁸ an observation also made recently by Lizé et al.⁶⁰ Some members of the miR-34 family⁶¹ were also induced during differentiation in both models, although to a lesser extent. Interestingly, miR-449 and miR-34 belong to a superfamily of microRNAs sharing a significant identity, including in the "seed" region that plays a crucial role in target recognition. The miR-449 family was first predicted through comparative genomics and verified by cloning from a pool of tissues.^{62,63} miR-449 miRNAs regulate cell growth and apoptosis.^{64,66} They were found highly expressed in mouse lung, trachea and testes.^{60,64} Additional works have highlighted the high expression of miR-449 and miR-34 miRNAs in mouse testis, suggesting a role in spermatogenesis regulation.^{67,68} In mouse male gonads, miR-34c-5p, the expression of which is largely p53-independent, could enhance the germinal phenotype of cells already committed to this lineage.⁶⁹ miR-449a has been shown to be expressed in mouse choroid plexus, a ciliated tissue, where it could potentially control cerebrospinal fluid production.⁷⁰ As we found that miR-449 accumulated specifically in multiciliated epithelial cells during differentiation of human airways and of *Xenopus* embryonic epidermis (Fig. 1A reviewed in ref. 18), we surmise that miR-449 may mark multiciliated cells of the choroid plexus, and play a role in fluid circulation in the brain. Expression of miR-449 is also deregulated in several pathological conditions. This is, for instance, the case in chicken airways after H5N3 in influenza virus infection, four days after inoculation.⁷¹

A synteny analysis of the host gene *Cdc20b* of the miR-449 cluster reveals a

conservation of miR-449 in all examined vertebrate genomes. Although the function of *CDC20B* remains unknown, we showed co-regulation of *CDC20B* and miR-449 during multiciliogenesis. We noticed that *CDC20B* protein was specifically expressed in multiciliated cells near basal bodies, which raises interesting questions about a possible functional synergy between miR-449 and its host gene during biogenesis of motile cilia. In both species, the specific invalidation of miR-449 (using antisense oligonucleotides) strongly suppressed multiciliogenesis, causing a concomitant reduction in the number of positive cells for tubulin (a marker of cilia) and for centrin-2 (a marker of basal bodies). Despite their abortive differentiation, miR-449-deficient cells maintained their identity of precursors of multiciliated cells, and continued to express *foxj1* mRNA, which encodes a key regulator of vertebrate motile ciliogenesis.^{4,11,12,15-17,72} miR-449 invalidation did not affect ciliogenesis in cells bearing a single motile cilium, suggesting a specific action of miR-449 on multiciliogenesis.¹⁸ These results suggest that miR-449 are required for triggering the multiciliogenesis at an early stage, before centriogenesis.¹⁸ It is noteworthy that induction of miR-449 expression has also been reported during myoblast differentiation and myofiber regeneration.⁷³ Differentiation of both skeletal muscle and multiciliated cells requires cell cycle exit together with centriolar material redistribution and spatiotemporal control of microtubule nucleation.⁷⁴ miR-449 may play a central role in this phenomenon.

Christodoulou et al. have recently explored the link between miRNAs and the establishment of tissue identities in bilaterian evolution.⁷⁵ They first outlined a minimum set of cell types and tissues that may have existed in the protostome-deuterostome ancestor. Then, by investigating the expression of conserved miRNAs in several bilaterian species, their comparative data identified sets of ancient miRNAs. Of particular note, miR-34 and miR-92 (also upregulated during human airway differentiation¹⁸) were detected in motile ciliated cells from protostome and deuterostome larvae in two distant bilaterian species, suggesting an ancient origin, conserved during evolution. By showing

that the miR-449 family of miRNAs, which is related to the miR-34 family, plays a crucial role in the establishment of ciliated identity in vertebrate evolution, our work confirms and extends the one by Christodoulou et al.

miR-449 Repress the Notch Pathway

Multicellular development requires the correct spatial and temporal regulation of cell division and differentiation. These processes are frequently coordinated by the activities of important signaling pathways such as the Notch pathway. Through *in silico* predictions and transcriptome analyses during differentiation or in response to overexpression of miR-449, we identified and validated two groups of targets. A first group code for proteins involved in cell cycle regulation. These first results are consistent with the ability of miR-449 to block the cell cycle, a critical step in the commitment to centriogenesis.¹⁸ Previously, miR-449a has been shown to block proliferation and to induce senescence-like phenotypes in prostate cancer cells.⁶⁵ A decrease/loss of miR-449a expression may correlate with actively proliferating cells and could be involved in diseases associated with age-related tissue dysfunction and cancer.^{64,65}

The second group of validated targets we found includes the receptor Notch1 and its ligand Delta-like-1 (DLL-1), in agreement with predictions made through genome-wide analyses of microRNAs signatures.⁷⁶ Regions of transcripts containing DLL-1 and Notch1 binding sites of miR-449 are conserved from frog to human. In human, miR-449 repressed the expression of both Notch1 and DLL1 whereas they only inhibited the expression of DLL-1 in *Xenopus*. Experiments performed in our two experimental models indicate that miR-449 controls multiciliogenesis by acting directly on the Notch signaling pathway: (1) The expression of DLL-1 and/or Notch1 mRNAs and proteins is repressed by overexpression of miR-449, while the opposite effect is observed after miR-449 invalidation; (2) in human mucociliary epithelium, DLL-1 and Notch1 are weakly expressed in multiciliated cells that highly express

miR-449, compared with surrounding cells; (3) in *Xenopus*, injection into the skin of a synthetic *Dll-1* mRNA lacking miR-449 binding sites repressed multiciliogenesis; (4) when oligonucleotides complementary to conserved binding sites for miR-449 in human Notch1 or *Xenopus* DLL-1 transcripts were used to protect these transcripts against the action of miR-449, they caused an elevation of endogenous Notch1 and/or DLL-1 mRNAs and proteins, and repressed multiciliogenesis. The effects of the invalidation of miR-449 on multiciliogenesis are thus mimicked directly by agents blocking the interaction between miR-449 and targets of the Notch pathway; (5) invalidation of DLL-1 or Notch1 increased multiciliogenesis and efficiently restored it in *Xenopus* embryos deficient for miR-449. Taken together, these data indicated that miRNAs of the miR-449 family trigger multiciliogenesis by directly repressing DLL-1 and Notch1.

The miR-449 family promotes centriologenesis and contributes to multiciliated cellular differentiation, by directly repressing the Notch signaling pathway and molecules related to cell cycle (Fig. 1B). In this sense, these miRNAs can be viewed as conductors controlling several molecular pathways that collectively promote the multiciliated phenotype. In agreement with the importance of Notch repression in multiciliated cells,^{18,56,57} it has been recently shown that Notch signaling was required for differentiation, but not self-renewal, of human airway basal cells. These cells are thought to be multipotent precursors that may help airway regeneration.^{77,78} This study revealed that sustained Notch activation in basal cells promoted their luminal differentiation, primarily toward secretory lineages.⁷⁷

Several studies have recently described additional links between miRNAs and Notch signaling in other systems. In mouse, the miRNA-processing enzyme Dicer is required for the maintenance of Notch signaling during retinal development.⁷⁹ miR-9 can promote differentiation of bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating the Notch signaling pathway.⁸⁰ miR-1 potently represses non-muscle gene expression and cell fate

during mouse and human embryonic stem cell differentiation by repressing DLL-1.⁸¹ In flies, several downstream target genes of Notch signaling have been validated as miRNA targets *in vivo*.⁸²⁻⁸⁴ miR-1 regulates Notch activity by repressing Delta expression during cardiac development in *Drosophila*.⁸⁵ In addition, miR-8 was identified as a negative regulator of Notch signaling in eye and wing imaginal discs by repressing the other Notch ligand, Serrate.⁸⁶ Finally, the miRNA pathway has been shown to promote Notch signaling by repressing Delta-mediated cis-inhibition of Notch in follicle cells.⁸⁷ Taken together, all these recent findings emphasize the importance of microRNA-mediated regulation of the Notch pathway in the control of cell fate, from invertebrates to human.

Conclusion

Our work, together with other recent reports has highlighted the importance of miRNA-based regulation of Delta/Notch signaling to control cell fate and differentiation. Importantly, we identified miR-449 as the first specific regulator of the multiciliated phenotype across vertebrates. We predict that continued search of miR-449 and Notch pathway targets should deliver key multiciliogenesis effectors, which remain largely unknown. In addition, CDC20B protein represents another interesting candidate since it appears to be a new component of basal bodies co-expressed with miR-449.¹⁸ By providing new insights into the mechanisms controlling multiciliogenesis, our study could also pave the way for the development of new therapeutic strategies to treat diseases associated with defects in cilia. The success of our comparative study in two remote tetrapods, illustrates the relevance of T. Dobzhansky's adage "nothing in biology makes sense except in the light of evolution."

Acknowledgments

This work was supported by CNRS, INSERM, Région Champagne-Ardenne, Région PACA, CG06 and by grants from ANR, Vaincre la Mucoviscidose, MicroEnviMet, ARC and INCa. We thank F. Aguila for artwork.

References

- Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 2000; 1:27-34; PMID:16263440; DOI:10.1053/prv.2000.0009.
- Fliegauf M, Benzing T, Omer H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:880-93; PMID:17955020; DOI:10.1038/nrm2278.
- Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 2009; 325:1131-4; PMID:19628819; DOI:10.1126/science.1173869.
- Gomperts BN, Gong-Cooper X, Hackett BP. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117:1329-37; PMID:14996907; DOI:10.1242/jcs.00978.
- Pearson CG, Culver BP, Winey M. Centrioles want to move out and make cilia. *Dev Cell* 2007; 13:319-21; PMID:17765674; DOI:10.1016/j.devcel.2007.08.007.
- Roy S. The motile cilium in development and disease: emerging new insights. *Bioessays* 2009; 31:694-9; PMID:19492356; DOI:10.1002/bies.200900031.
- Vladar EK, Stearns T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol* 2007; 178:31-42; PMID:17606865; DOI:10.1083/jcb.200703064.
- Cunha-Ferreira I, Bento I, Bettencourt-Dias M. From zero to many: control of centriole number in development and disease. *Traffic* 2009; 10:482-98; PMID:19416494; DOI:10.1111/j.1600-0854.2009.00905.x.
- Duenning A, Liu Y, Perdreaux SA, Kleylein-Sohn J, Hagg EA, Duenning S. Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 2007; 26:6280-8; PMID:17438528; DOI:10.1038/sj.onc.1210456.
- Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* 1998; 102:1077-82; PMID:9739041; DOI:10.1172/JCI4786.
- Clevidence DE, Overdier DG, Peterson RS, Porcella A, Ye H, Paulson KE, et al. Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter. *Dev Biol* 1994; 166:195-209; PMID:7958446; DOI:10.1006/dbio.1994.1307.
- Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280:R23-38; PMID:11290504.
- Look DC, Walter MJ, Williamson MR, Pang L, You Y, Sreshta JN, et al. Effects of paramyxoviral infection on airway epithelial cell Foxj1 expression, ciliogenesis and mucociliary function. *Am J Pathol* 2001; 159:2055-69; PMID:11733356; DOI:10.1016/S0002-9440(10)63057-X.
- Murphy DB, Seemann S, Wiese S, Kirschner R, Grzeschik KH, Thies U. The human hepatocyte nuclear factor 3/fork head gene FKHL13: genomic structure and pattern of expression. *Genomics* 1997; 40:462-9; PMID:9073514; DOI:10.1006/geno.1996.4587.
- Yu X, Ng CP, Habacher H, Roy S. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet* 2008; 40:1445-53; PMID:19011630; DOI:10.1038/ng.263.
- Brody SL, Yan XH, Wuertel MK, Song SK, Shapiro SD. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:45-51; PMID:10873152.

17. Stubbs JL, Qi Z, Ispisua Belmonte JC, Kintner C. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like dila in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat Genet* 2008; 40:1454-60; PMID:19011629; DOI:10.1038/ng.267.
18. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosa LE, Cibois M, et al. Control of vertebrate multiliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011; 13:693-9; PMID:21602795; DOI:10.1038/nb2241.
19. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-97; PMID:14744438; DOI:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
20. Giovannini-Chami L, Grandvaux N, Zaragosa LE, Robbe-Sermesant K, Marcet B, Cardinaud B, et al. Impact of MicroRNA in Normal and Pathological Respiratory Epithelia. *Methods Mol Biol* 2011; 741:171-91; PMID:21594785; DOI:10.1007/978-1-61779-117-8_12.
21. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. *Cell* 2004; 116:89-92; PMID:15055592; DOI:10.1016/S0092-8674(04)00035-2.
22. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9:102-14; PMID:18197166; DOI:10.1038/nrg2290.
23. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23:4051-60; PMID:15372072; DOI:10.1038/sj.emboj.7600385.
24. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13:1097-101; PMID:17099701; DOI:10.1038/nsmb1167.
25. Denli AM, Tops BB, Plasterik RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432:231-5; PMID:15531879; DOI:10.1038/nature03049.
26. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Dorstots B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432:235-40; PMID:15723116; DOI:10.1038/nature03120.
27. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21:4663-70; PMID:12198168; DOI:10.1093/emboj/cdf476.
28. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 2011; 12:19-31; PMID:21116305; DOI:10.1038/nrg2916.
29. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3:85; PMID:15723116; DOI:10.1371/journal.pbio.0030085.
30. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; 18:504-11; PMID:15014042; DOI:10.1101/gad.1184404.
31. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120:15-20; PMID:15652477; DOI:10.1016/j.cell.2004.12.035.
32. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010; 140:652-65; PMID:2111135; DOI:10.1016/j.cell.2010.01.007.
33. Chi SW, Zhang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 2009; 460:479-86; PMID:19536157.
34. Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 2010; 141:129-41; PMID:20371350; DOI:10.1016/j.cell.2010.03.009.
35. Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbey P, MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 2010; 26:3131-2; PMID:20959382; DOI:10.1093/bioinformatics/btq589.
36. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434:338-45; PMID:15735639; DOI:10.1038/nature03441.
37. Chen CY, Zheng D, Xia Z, Shyu AB. Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:1160-6; PMID:19838187; DOI:10.1038/nsmb.1709.
38. Bulalio A, Hunzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132:9-14; PMID:18191211; DOI:10.1016/j.cell.2007.12.024.
39. Bulalio A, Hunzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 2009; 15:21-32; PMID:19029310; DOI:10.1261/rna.1399509.
40. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:4034-9; PMID:16495412; DOI:10.1073/pnas.0510928103.
41. Korak M. Faulty old ideas about translational regulation paved the way for current confusion about how microRNAs function. *Gene* 2008; 423:108-15; PMID:18692553; DOI:10.1016/j.gene.2008.07.013.
42. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 2004; 10:1518-25; PMID:15337849; DOI:10.1261/rna.7131604.
43. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T, et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* 2009; 461:754-61; PMID:19812667; DOI:10.1038/nature08434.
44. Selbach M, Schwanhauss B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455:58-63; PMID:18668040; DOI:10.1038/nature07228.
45. Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puissegur MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS ONE* 2009; 4:6718; PMID:19701459; DOI:10.1371/journal.pone.0006718.
46. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:252-63; PMID:20216554; DOI:10.1038/nrm2868.
47. Harris KS, Zhang Z, McManus MT, Harfe BD, Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:2208-13; PMID:16452165; DOI:10.1073/pnas.0510839103.
48. Bhattacharyya S, Balakrishnan NS, Dalgard C, Gurti U, Armistead D, Jozwik C, et al. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyper-expression of interleukin-8. *J Biol Chem* 2011; In press.
49. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, Stallings RL, O'Neill SJ, McElvaney NG, et al. miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol* 2010; 184:1702-9; PMID:20083669; DOI:10.4049/jimmunol.0902669.
50. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease—master regulators or target practice? *Respir Res* 2010; 11:148; PMID:21029443; DOI:10.1186/1465-9921-11-148.
51. Coraux C, Nawrocki-Raby B, Hinnrasky J, Kilestky C, Gaillard D, Dani C, et al. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32:87-92; PMID:15576671; DOI:10.1165/rmb.2004-0079RC.
52. Coraux C, Roux J, Jolly T, Birembaut P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:689-94; PMID:18684718; DOI:10.1513/pats.200801-010AW.
53. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:772-7; PMID:18757316; DOI:10.1513/pats.200805-041HR.
54. Hayes JM, Kim SK, Abtata PB, Park TJ, Herrington ER, Kitayama A, et al. Identification of novel oligonucleotide factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Dev Biol* 2007; 312:115-30; PMID:17961536; DOI:10.1016/j.ydbio.2007.09.031.
55. Deblandre GA, Wettstein DA, Koyano-Nakagawa N, Kintner C. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the alveolar cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* 1999; 126:4715-28; PMID:10518489.
56. Guseh JS, Bores SA, Stanger EZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, et al. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development* 2009; 136:1751-9; PMID:19369400; DOI:10.1242/dev.029249.
57. Tao PN, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso WV. Notch signaling controls the balance of alveolar and secretory cell fates in developing airways. *Development* 2009; 136:2297-307; PMID:19502490; DOI:10.1242/dev.034884.
58. Sprinzak D, Lakhanpal A, Lebon L, Santar LA, Fontes ME, Anderson GA, et al. Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 2010; 465:86-90; PMID:20418862; DOI:10.1038/nature08959.
59. Kopan R, Ilgan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; 137:216-33; PMID:19379690; DOI:10.1016/j.cell.2009.03.045.
60. Lizé M, Herr C, Klimke A, Bals R, Döbelstein M. MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia. *Cell Cycle* 2010; 9:4579-83; PMID:21088493; DOI:10.4161/cc.9.22.13870.
61. Cardinaud B, Moreillon C, Marcet B, Robbe-Sermesant K, Lebrigand K, Mari B, et al. miR-34b/miR-34c: a regulator of T cell expression in 11q-chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia* 2009; 23:2174-7; PMID:19536169; DOI:10.1038/leu.2009.125.
62. Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, et al. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:1765-71; PMID:16582102; DOI:10.1093/nar/gkl096.
63. Wheeler G, Ntouni-Fousara S, Granda B, Rathjen T, Dalmay T. Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs. *FEBS Lett* 2006; 580:2195-200; PMID:16566924; DOI:10.1016/j.febslet.2006.03.019.
64. Lize M, Pilsarski S, Döbelstein M. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2009; 17:452-8.
65. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* 2009; 28:1714-24; PMID:19252524; DOI:10.1038/onc.2009.19.
66. Noonan EJ, Place RF, Basak S, Pookot D, Li LC. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. *Oncotarget* 2010; 1:349-58; PMID:20948989.

67. Buchold GM, Coarfa C, Kim J, Milosavljevic A, Gunaratne PH, Matzuk MM. Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis. *PLoS ONE* 2010; 5:15317; PMID:21206922; DOI:10.1371/journal.pone.0015317.
68. Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction* 2007; 134:73-9; PMID:17641090; DOI:10.1530/REP-07-0056.
69. Bouhallier F, Alloli N, Laval F, Chalmel F, Perrard MH, Durand P, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 2010; 16:720-31; PMID:20150330; DOI:10.1261/rna.1963810.
70. Redshaw N, Wheeler G, Hajhosseini MK, Dalmay T. microRNA-449 is a putative regulator of choroid plexus development and function. *Brain Res* 2009; 1250:20-6; PMID:19056356; DOI:10.1016/j.brainres.2008.11.020.
71. Wang Y, Brahmakshatriya V, Zhu H, Luptani B, Reddy SM, Yoon BJ, et al. Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach. *BMC Genomics* 2009; 10:512; PMID:19891781; DOI:10.1186/1471-2164-10-512.
72. Huang T, You Y, Spoor MS, Richer EJ, Kudva VV, Paige RC, et al. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J Cell Sci* 2003; 116:4935-45; PMID:14625387; DOI:10.1242/jcs.00830.
73. Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M, et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J* 2009; 23:3335-46; PMID:19528256; DOI:10.1096/fj.08-128579.
74. Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: are-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:161-73; PMID:17245416; DOI:10.1038/nrm2100.
75. Christodoulou F, Raible F, Tomer R, Simakov O, Trachana K, Klaus S, et al. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature* 2010; 463:1084-8; PMID:20118916; DOI:10.1038/nature08744.
76. Tsang JS, Ebert MS, van Oudenaarden A. Genome-wide dissection of microRNA functions and cotargeting networks using gene set signatures. *Mol Cell* 2010; 38:140-53; PMID:20385095; DOI:10.1016/j.molcel.2010.03.007.
77. Rodk JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong YY, Hogan BL. Notch-dependent differentiation of adult airway Basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8:639-48; PMID:21624809; DOI:10.1016/j.stem.2011.04.003.
78. Hajj R, Baranek T, Le Naour R, Lesimple P, Puchelle E, Coraux C. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells* 2007; 25:139-48; PMID:17008423; DOI:10.1634/stemcells.2006-0288.
79. Georg SA, Reh TA. Dicer is required for the maintenance of Notch signaling and gliogenic competence during mouse retinal development. *Dev Neurobiol* 2011; in press; PMID:21542136.
80. Jing L, Jia Y, Lu J, Han R, Li J, Wang S, et al. MicroRNA-9 promotes differentiation of mouse bone mesenchymal stem cells into neurons by Notch signaling. *Neuroreport* 2011; 22:206-11; PMID:21346646; DOI:10.1097/WNR.0b013e328344a666.
81. Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2:219-29; PMID:18371447; DOI:10.1016/j.stem.2008.01.016.
82. Lai EC. miRNAs: whys and wherefores of miRNA-mediated regulation. *Curr Biol* 2005; 15:458-60; PMID:15964265; DOI:10.1016/j.cub.2005.06.015.
83. Lai EC, Tam B, Rubin GM. Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box, Brd-box- and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* 2005; 19:1067-80; PMID:15833912; DOI:10.1101/gad.1291905.
84. Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2003; 1:60; PMID:14691535; DOI:10.1371/journal.pbio.0000060.
85. Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18986-91; PMID:16357195; DOI:10.1073/pnas.0509535102.
86. Vallejo DM, Caparros E, Dominguez M. Targeting Notch signalling by the conserved miR-8/200 microRNA family in development and cancer cells. *EMBO J* 2011; 30:756-69; PMID:21224847; DOI:10.1038/emboj.2010.358.
87. Poulton JS, Huang YC, Smith L, Sun J, Leake N, Schleele J, et al. The microRNA pathway regulates the temporal pattern of Notch signaling in *Drosophila* follicle cells. *Development* 2011; 138:1737-45; PMID:21447549; DOI:10.1242/dev.059352.

© 2011 Landes Bioscience.
Do not distribute.

Des microARN contrôlent la fabrication de cils vibratiles chez les vertébrés

Benoît Chevalier, Laurent Kodjabachian, Christelle Coraux, Pascal Barbry, Brice Marcet

Cellules multiciliées, un rôle-clé dans de multiples fonctions tissulaires

Les cellules multiciliées bordant la surface de certains tissus sont présentes chez tous les vertébrés et possèdent à leur surface des centaines de cils vibratiles, organites constitués de microtubules (Figure 1). Le battement coordonné des cils vibratiles permet un mouvement liquidien efficace, qui joue un rôle important dans divers processus physiologiques comme l'évacuation par l'appareil respiratoire des particules inhalées piégées dans le mucus (clairance mucociliaire), la circulation du liquide céphalo-rachidien ou la migration de l'embryon dans le tractus génital [1, 2]. Les dyskinésies ciliaires, la mucoviscidose, l'asthme, les bronchopneumopathies chroniques obstructives ou encore l'hydrocéphalie sont autant de maladies où un dysfonctionnement primaire ou secondaire des cils vibratiles peut contribuer à l'aggravation de symptômes respiratoires, cérébraux, ou reproductifs [1, 2]. L'élucidation des mécanismes gouvernant la synthèse de ces cils vibratiles apparaît ainsi comme une question fondamentale de biologie avec des implications biomédicales évidentes.

La fabrication des cils vibratiles (multiciliogenèse) intervient au cours du développement et lors de la régénération de certains épithéliums spécialisés, notamment mucociliaires. La multiciliogenèse nécessite : (1) la sortie du cycle cellulaire ; (2) la production

de centaines de corps basaux grâce à la multiplication massive de centrioles (centriogenèse) ; (3) la migration et l'ancrage des corps basaux à la surface apicale où ils jouent le rôle de centre organisateur des microtubules, à la base de chaque cil [3]. Quels sont les mécanismes contrôlant l'élaboration de multiples cils vibratiles dans une même cellule ? Afin de répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à deux exemples d'épithélium mucociliaire : le premier borde les voies aériennes des mammifères ; le second correspond à l'épiderme d'embryons d'amphibiens. Tous deux disposent à la fois de cellules sécrétrices de mucus et de cellules multiciliées [4-6] (Figure 1A et 1B). Nous avons entrepris une étude comparative systématique de la multiciliogenèse dans l'épithélium bronchique humain et dans l'épiderme d'embryon de xénope (*Xenopus laevis*) afin d'identifier les microARN et leurs gènes cibles potentiellement impliqués dans la mise en place de la multiciliogenèse.

Les microARN (miARN ou miR) appartiennent à une classe de petits ARN simple brin non codants régulateurs, contrôlant de nombreux processus biologiques en réprimant l'expression génique par différents mécanismes post-transcriptionnels [7]. Chaque miARN est capable de cibler un ou plusieurs ARN messagers (ARNm) par le jeu d'appariements avec une ou plusieurs séquences généralement localisées dans la région 3' non traduite des cibles. La découverte des

B. Chevalier, P. Barbry, B. Marcet : CNRS, Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, UMR-6097, Sophia-Antipolis ; Université de Nice-Sophia-Antipolis, Sophia-Antipolis, F06560, France.
L. Kodjabachian : CNRS, Institut de biologie du développement de Marseille-Luminy, UMR-6216 ; Université de la Méditerranée, Marseille, F13288, France.
C. Coraux : Inserm U903, Reims, F51092, France ; Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, F51100, France.
barbry@ipmc.cnrs.fr
marcet@ipmc.cnrs.fr

miARN a fourni un nouveau paradigme associant répression de gènes-clés et destin cellulaire. Des miARN ont ainsi été impliqués dans la morphogenèse pulmonaire ou dans certaines pathologies respiratoires [7-10]. Nous avons récemment démontré le premier lien fonctionnel, conservé des amphibiens à l'homme, entre une famille de miARN et la multiciliogenèse [11].

Expression de la famille miR-449 pendant la multiciliogenèse

Nous avons établi par séquençage à haut débit les signatures des miARN au cours de la différenciation mucociliaire de l'épithélium bronchique humain et de l'épiderme embryonnaire de xénope. La famille miR-449 (miR-449a, miR-449b et miR-449c) représente les miARN les plus fortement induits pendant la multiciliogenèse chez les deux espèces. Par différentes approches combinant hybridation *in situ*, immunohistochimie, tri cellulaire et séquençage, nous avons pu établir la spécificité d'expression des miR-449 dans les cellules multiciliées dans nos deux modèles [11] (Figure 1). Une analyse de synténie du gène hôte *Cdc20b* du cluster miR-449 révèle la conservation du locus dans tous les génomes de vertébrés examinés. Bien que la fonction de CDC20B demeure inconnue, nous avons montré la corégulation de CDC20B et de miR-449 pendant la multiciliogenèse,



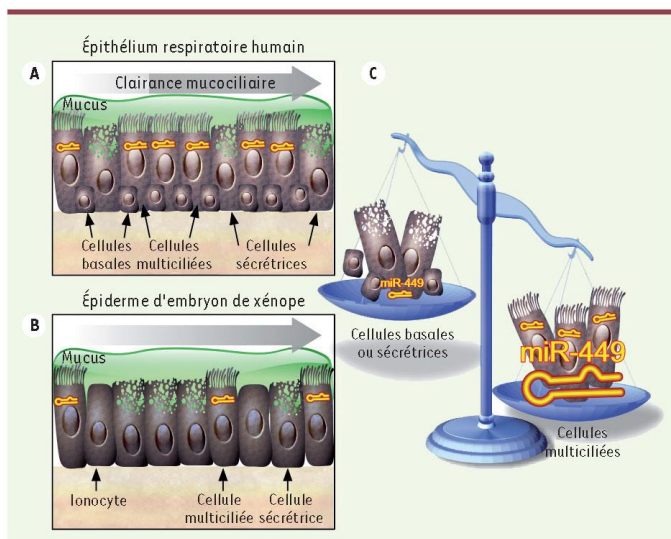


Figure 1. Expression spécifique de miR-449 dans les cellules multiciliées. Les épithéliums mucociliaires tels que l'épithélium bronchique humain (A) ou l'épiderme embryonnaire de xénope (B) sont constitués de cellules sécrétrices de mucus et de cellules multiciliées. L'épithélium bronchique contient également des cellules basales qui pourraient servir de réservoir pour la réparation. L'épiderme du xénope contient également des cellules spécialisées dans le transport d'ions, appelées ionocytes. C. Les membres de la famille miR-449 sont fortement enrichis dans les cellules multiciliées tandis que leur niveau d'expression n'est quasiment pas détectable dans les autres types cellulaires.

suggérant une possible synergie entre le miARN et son gène hôte.

Chez les deux espèces, l'invalidation spécifique de miR-449 (à l'aide d'oligonucléotides antisens) réprime fortement la multiciliogenèse, causant la réduction concomitante du nombre de cellules exprimant la tubuline (un marqueur des cils vibratiles) et la centrine-2 (un marqueur des corps basaux). Malgré leur différenciation avortée, les cellules déficientes pour miR-449 maintiennent leur identité de précurseurs ciliés et continuent d'exprimer l'ARNm *foxj1*, qui code pour un régulateur-clé de la multiciliogenèse chez les vertébrés [3] (Figure 2). Précisons que l'invalidation de miR-449 n'altère pas la ciliogenèse des cellules portant un cil vibratile unique, suggérant une action spécifique de miR-449 sur la multiciliogenèse. Ces résultats suggèrent que les miR-449 sont requis pour le déclenchement de la multiciliogenèse à une étape précoce, avant la centriologénèse [11].

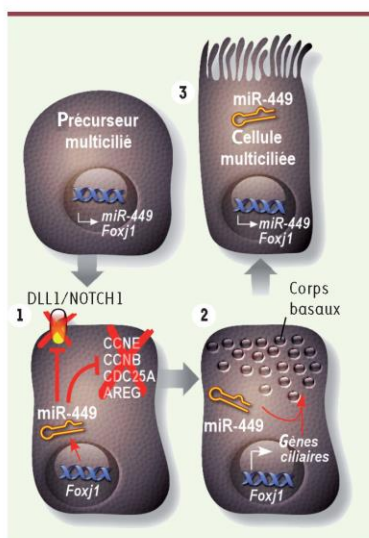
miR-449 réprime le cycle cellulaire et la voie Notch1/Delta1

En analysant le transcriptome au cours de la différenciation ou en réponse à la

surexpression de miR-449, nous avons identifié des cibles potentielles de miR-449. Un premier groupe de cibles, validées expérimentalement, code pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (amphiréguline, cycline B1, cycline E2 et Cdc25A). Ces résultats sont en accord avec la capacité de miR-449 à bloquer le cycle cellulaire, une étape cruciale avant l'engagement dans la centriologénèse [11].

Le second groupe de cibles validées dans les deux espèces correspond au récepteur Notch1 et à son ligand Delta-1 (DLL1). Dans nos deux modèles, l'activation de la voie de signalisation Notch est incompatible avec la différenciation des cellules multiciliées. Les régions des transcrits *Dll1* et *Notch1* contenant les sites de fixation de miR-449 sont conservées de la grenouille à l'homme. Chez l'homme, les miARN de la famille miR-449 répriment l'expression à la fois de *Dll1* et de *Notch1* tandis qu'ils inhibent seulement l'expression de *Dll1* chez le xénope. Plusieurs expériences indiquent que, dans nos deux modèles, les miR-449 contrôlent la multiciliogenèse en agissant directement sur la voie de signalisation Notch : (1) l'expression des transcrits et des protéi-

nes DLL1 et/ou Notch1 est réprimée par la surexpression de miR-449 tandis que l'effet opposé est observé après son invalidation ; (2) DLL1 et/ou Notch1 sont faiblement exprimées dans les cellules multiciliées qui expriment fortement miR-449 par rapport aux cellules environnantes dans l'épithélium mucociliaire humain ; (3) l'injection dans l'épiderme de xénope d'un ARNm *Dll1* synthétique dépourvu des sites de fixation de miR-449 réprime la multiciliogenèse, tout comme le fait la perte de miR-449 ; (4) des oligonucléotides complémentaires des sites de liaison conservés de miR-449 dans les transcrits *Notch1* ou *Dll1* protègent ces transcrits contre l'action de miR-449. Ces oligonucléotides protecteurs provoquent l'élévation des transcrits et des protéines endogènes Notch1 et/ou DLL1 et répriment la multiciliogenèse. Les effets de l'invalidation de miR-449 sur la multiciliogenèse sont ainsi mimés par des agents bloquant l'interaction entre miR-449 et ses cibles de la voie Notch ; (5) enfin, l'invalidation de *Dll1* ou *Notch1* augmente la multiciliogenèse et la rétablit de manière efficace dans les embryons de xénope invalidés pour miR-449. L'ensemble de ces données indique que



les miR-449 déclenchent le processus de multiciliogenèse en réprimant directement les cibles DLL1 et Notch1.

À la recherche des effecteurs-clés de la multiciliogenèse

En conclusion, notre étude révèle pour la première fois le rôle joué par les miARN de la famille miR-449 en tant que régulateurs-clés et conservés de la multiciliogenèse chez les vertébrés. La famille miR-449 favorise la centriogenèse et contribue à la différenciation des cellules multiciliées en réprimant directement la voie de signalisation Notch et des molécules liées au cycle cellulaire (Figure 2) [11]. En ce sens, ces miARN peuvent apparaître comme des chefs d'orchestre modulant simultanément plusieurs voies de signalisation importantes afin de promouvoir le phénotype multicilié. La poursuite de la recherche des cibles de

Figure 2. Modèle illustrant le rôle de miR-449 au cours de la multiciliogenèse. La multiciliogenèse est initiée par l'acquisition de l'identité ciliaire. Dans les progéniteurs de cellules multiciliées, l'expression de miR-449 et du facteur de transcription FOXJ1 est induite. L'expression de miR-449 permet de bloquer le cycle cellulaire et l'expression de DLL1 et/ou Notch1 ce qui entraîne l'entrée dans le processus de différenciation (phase 1). Dans la phase 2, l'expression de miR-449 favorise la multiplication massive des corps basaux. L'expression conjointe de miR-449 et FOXJ1 participe ensuite à la migration et l'ancrage de ces corps basaux néosynthétisés à la surface apicale. FOXJ1 induit l'expression des gènes nécessaires à l'assemblage de l'axone et à l'élongation des cils vibratiles (phase 3). L'expression de miR-449 reste élevée dans les cellules multiciliées suggérant un rôle probable dans le maintien de ce phénotype.

miR-449 et de la voie Notch devrait identifier les effecteurs-clés de la multiciliogenèse, qui restent très largement méconnus. Un autre candidat particulièrement intéressant est CDC20B puisque cette protéine paraît être un nouveau composant des corps basaux coexprimé avec miR-449 [11]. Gageons qu'en fournissant de nouvelles connaissances sur les mécanismes conservés contrôlant la multiciliogenèse, notre étude pourrait également ouvrir la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à traiter les pathologies associées à des défauts de cils vibratiles. Le succès de notre étude comparative chez deux tétrapodes distants illustre enfin la pertinence de l'adage selon lequel « rien en biologie n'a de sens qu'à la lumière de l'évolution ».

MicroRNA control biosynthesis of motile cilia in vertebrates

CONFLIT D'INTÉRÊTS


Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 2000 ; 1 : 27-34.
2. Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 880-93.
3. Vladar EK, Stearns T. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol* 2007 ; 178 : 31-42.
4. Coraux C, Roux J, Jolly T, et al. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc Am Thorac Soc* 2008 ; 5 : 689-94.
5. Hajji R, Baranek T, Le Naour R, et al. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 139-48.
6. Hayes JM, Kim SK, Abitua PB, et al. Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Dev Biol* 2007 ; 312 : 115-30.
7. Giovannini-Chami L, Grandvaux N, Zaragosi LE, et al. Impact of MicroRNA in normal and pathological respiratory epithelia. *Methods Mol Biol* 2011 ; 741 : 171-91.
8. Bhattacharyya S, Balakathiresan NS, Dalgard C, et al. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyper-expression of interleukin-8. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 11604-11.
9. Harris KS, Zhang Z, McManus MT, et al. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 2208-13.
10. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, et al. miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol* 2010 ; 184 : 1702-9.
11. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, et al. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 694-701.

TIRÉS À PART

P. Barbry et B. Marcet



Tarifs d'abonnement m/s - 2011


Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 674 dans ce numéro de m/s



II. MiR-449 contrôle le remodelage du cytosquelette d'actine au pôle apical des cellules multiciliées lors de la multiciliogenèse en ciblant la voie des petites GTPases.

Article 4 en phase de soumission: Chevalier B., Adamiok A., Merecey O., Zaragosi L-E, Pasini A., Kodjabachian L, Barbry P & Marcet B. miR-449 controls apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase signaling.

Contexte de l'étude

Une étape précoce de la multiciliogenèse concerne l'ancrage des corps basaux néosynthétisés sous la membrane apicale. Ce processus nécessite la réorganisation préalable du réseau apical d'actine d'une manière qui est dépendante de RhoA et FoxJ1 (Pan et al., 2007). Cette réorganisation du réseau d'actine est caractérisée par un enrichissement de filaments d'actine et de protéines de liaisons à l'actine (e.g. ezrine) sous la membrane apicale des cellules multiciliées (Huang et al., 2003) (cf. partie III. 3. A. 5)).

Les petite GTPases sont des régulateurs importants du remodelage du cytosquelette : leur fonction dépend de leur état d'activation (liaison au GTP) qui peut être finalement modulée à plusieurs niveaux (cf. partie III. 3. A. 2)). Les RhoGDIs maintiennent notamment les petites protéines G dans un état inactif (liée au GDP). Ici nous avons émis l'hypothèse que miR-449 pourrait contrôler l'activité ou l'expression de certaines petites GTPases.

Résultats obtenus

Réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la multiciliogenèse.

Nous avons étudié l'enrichissement apical du cytosquelette d'actine à partir de nos deux modèles d'épithéliums mucociliés de vertébrés.

Nous avons d'abord noté un enrichissement apical de filaments d'actine au niveau des progéniteurs des cellules multiciliées chez les deux espèces étudiées. Cet enrichissement est maintenu dans les cellules multiciliées pleinement différenciées. Chez l'homme, des marquages en immunofluorescence permettant d'identifier l'ezrine, confirment aussi un enrichissement de cette

protéine au pôle apical des cellules multiciliées, reflétant la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine. Par ailleurs, la cofiline-1 est une protéine impliquée dans les cycles de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. Sa phosphorylation, qui inactive cette fonction de la cofiline-1, sert ainsi de marqueur de stabilité du réseau d'actine. Lors de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de la cofiline-1 jusqu'à l'étape de polarisation de l'épithélium puis une rapide diminution de la forme phosphorylée de cette protéine de manière concomitante avec 1) la multiciliogenèse et l'induction de miR-449, 2) l'enrichissement de l'eitrine au pôle apical des cellules multiciliées, 3) une augmentation de la protéine de liaison aux complexes ERM (Ezrine/Radixin/Moesin), la protéine EBP50. L'ensemble de ces observations indique un remodelage important du cytosquelette d'actine dans les cellules multiciliées lors de leur différenciation. Les mêmes observations ont été faites dans nos deux modèles expérimentaux.

MiR-449 contrôle l'enrichissement apical d'actine des cellules multiciliées chez les vertébrés.

La surexpression de miR-449 dans les cellules épithéliales respiratoires en prolifération conduit à une augmentation du nombre de fibres de stress d'actine, à une augmentation de la forme phosphorylée des protéines ERM comme cela est aussi observé dans les cellules multiciliées, ainsi qu'à une diminution de la forme phosphorylée de la cofiline-1. Par ailleurs, des mesures de l'activité des petites GTPases montrent que la surexpression de miR-449 entraîne une augmentation de l'activation de RhoA sans affecter significativement l'activité des petites GTPases Rac, tandis que l'invalidation de miR-449 au cours de la différenciation conduit à une inhibition de l'activité de RhoA. L'ensemble de ces observations suggèrent un lien fonctionnel fort entre miR-449 et le remodelage du cytosquelette d'actine.

L'invalidation de miR-449 dans nos deux modèles bloque la multiciliogénèse, comme précédemment montré. Elle bloque également l'enrichissement apical d'actine dans les progéniteurs des cellules multiciliées. Chez l'homme, cette perte d'enrichissement apical d'actine, est quantifiée en mesurant le nombre de cellules positives pour l'eitrine. Le blocage de miR-449 *in vitro* induit une diminution du nombre de cellules positives à l'eitrine. Chez le Xénope, on observe également une perte de l'enrichissement apical de l'actine dans les cellules injectées.

Ces résultats indiquent que miR-449 est requis pour la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine dans les cellules multiciliées chez les vertébrés.

R-Ras et RhoGDI2 sont des cibles directes de miR-449.

Une stratégie combinant approches expérimentales et *in silico* nous a permis d'identifier et de valider *Arhgdib* (un gène codant pour RhoGDI2, un inhibiteur de la protéine RhoA) et *Rras* (R-Ras, une petite protéine G de la famille Ras) comme nouvelles cibles de miR-449. R-Ras et RhoGDI2 sont réprimées au niveau transcriptionnel et protéique aussi bien en réponse à l'expression de miR-449 qu'au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain d'une manière inversement proportionnelle à l'augmentation d'expression de miR-449. En utilisant une approche de gènes rapporteurs pour la luciférase placés sous le contrôle en 3'-UTR de *Rras* et d'*Arhgdib* sauvage ou muté, nous avons montré que miR-449 ciblait spécifiquement les 3'-UTR de *Rras* et d'*Arhgdib*. De plus, nous avons observé que l'expression protéique de R-Ras et RhoGDI2 était majoritairement exclue des cellules multiciliées. Ces résultats indiquent que R-Ras et RhoGDI2 sont des cibles directes de miR-449 chez l'homme. Chez le Xénope, aucune expression de RhoGDI2 n'a été retrouvée dans des explants d'épiderme alors que celle de R-Ras est fortement diminuée au cours de la différenciation de l'épiderme d'une manière inversement corrélée avec l'augmentation d'expression de miR-449. Ainsi chez le Xénope, contrairement à R-Ras, RhoGDI2 ne semble pas être une cible conservée de miR-449.

Nous nous sommes alors focalisés sur l'étude fonctionnelle du rôle de R-Ras et de sa répression par miR-449 durant la multiciliogénèse dans nos deux modèles.

La répression de R-Ras par miR-449 est nécessaire pour la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine et pour la multiciliogénèse dans les cellules multiciliées.

Le contrôle de la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine et de la multiciliogénèse par miR-449 via l'inhibition de R-Ras a ensuite été étudié dans nos deux modèles, par l'approche de protection de cible précédemment décrite. Dans les deux espèces, la protection de R-Ras induit bien un blocage de la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine et de la multiciliogénèse, mimant ainsi les effets obtenus par l'invalidation de miR-449. De manière inattendue, l'invalidation de R-Ras à un stade précoce de différenciation, à l'aide de siARN ou de morpholinos, entraîne également un blocage du remaniement apical d'actine et de la multiciliogénèse, suggérant que l'expression de R-Ras à un stade précoce de différenciation serait requise pour la multiciliogénèse. Par ailleurs, l'invalidation de R-Ras dans les morphants protégés par le protecteur de R-Ras restaure la formation du réseau d'actine apicale et la multiciliogénèse, indiquant la spécificité de R-Ras dans ce processus. Par contre, l'invalidation de R-Ras n'affecte pas l'activité des petites GTPases Rho ou Rac. C'est donc par le biais d'une autre voie de signalisation que cette régulation se mettrait en place.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats démontre que la répression spécifique de R-Ras par miR-449 permet de contrôler le remodelage apical du réseau d'actine au cours de la multiciliogénèse chez les vertébrés. Incidemment, nos données ont permis d'identifier R-Ras comme nouvel acteur conservé de la multiciliogénèse, de montrer que son expression à un stade précoce est requise et que son inhibition par miR-449 à un stade plus tardif est indispensable pour que les processus de réorganisation apicale du cytosquelette d'actine et de multiciliogénèse se déclenchent.

**miR-449 controls apical actin network formation during multiciliogenesis through small
GTPase signaling**

Benoît Chevalier^{1,2,*}, Anna Adamiok^{3*}, Olivier Mercey^{1,2}, Laure-Emmanuelle Zaragosi^{1,2},
Andrea Pasini³, Laurent Kodjabachian³, Pascal Barbry^{1,2,†}, Brice Marcet^{1,2,†}

¹ CNRS-IPMC, UMR-7275, Sophia-Antipolis, France.

² University of Nice-Sophia-Antipolis (UNS), Sophia-Antipolis, France.

³ Aix-Marseille Université, CNRS, UMR7288, Institut de Biologie du Développement de
Marseille (IBDM), Marseille, France.

* These authors contributed equally

† Correspondence should be addressed to Brice Marcet and Pascal Barbry: marcet@ipmc.cnrs.fr,
barbry@ipmc.cnrs.fr; IPMC-CNRS/UNS, UMR-7275, 660 Route des Lucioles, 06560 Sophia-
Antipolis, Valbonne, France.

Phone : 00-33-(0)4-93-95-77-93

Fax : 00-33-(0)4-93-95-77-94

Number of characters (without space) (max 20000) (except Materials & Methods, References) :

Abstract

Multiciliated cells, found throughout the whole metazoan kingdom, contribute to multiple biological processes. Recently, we demonstrated that microRNAs of the miR-449 family allow differentiation of vertebrate multiciliated cells by repressing the Notch pathway. Here, we report that reorganization of the apical actin cytoskeleton, a prerequisite for basal bodies anchoring and cilia elongation, is also controlled by miR-449. Using human airway primary cultures and *Xenopus* embryonic epidermis we show that miR-449 silencing inhibits RhoA activity and apical actin web formation in multiciliated cells. We identify transcripts coding the small GTPase R-Ras and the Rho inhibitor RhoGDI2 as bona fide targets of miR-449. Apical actin reorganization and multiciliogenesis were impaired when the *RRAS* mRNA was protected from miR-449 binding. Multiciliogenesis was however rescued when the translation of protected *RRAS* transcripts was prevented. Altogether, our data demonstrate that miR-449 act at several distinct steps of the multiciliogenesis process in vertebrates, and identify R-Ras as a new player in this phenomenon.

Introduction

Multiciliated cells (MCCs), characterized by the presence at their apical surface of multiple motile cilia, have been described in many vertebrates (Fliegauf et al., 2007; Roy, 2009; Satir and Christensen, 2007). Coordinated ciliary beating allows efficient fluid movement and is required for physiological processes such as evacuation of mucus from the respiratory tract, circulation of the cerebrospinal fluid, or migration of the embryo in the genital tract (Fliegauf et al., 2007). The physiological importance of MCCs is highlighted by the large number of human disorders associated with defects of the motile cilia (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009; Fliegauf et al., 2007; Marshall, 2008; Roy, 2009). Multiciliogenesis, which occurs during normal development and during regeneration of damaged tissues, can be studied in several experimental setups, including primary cultures of human airway epithelium (LeSimple et al., 2007) and *Xenopus* embryonic epidermis (Hayes et al., 2007). A few stereotypical steps are observed: (i) exit from the cell cycle of MCC precursors, (ii) massive postmitotic multiplication of centrioles (centriologensis), (iii) reorganization of the apical actin cytoskeleton into a dense cortical meshwork of actin, (iv) migration of the newly synthesized centrioles towards the apical pole of the cell, where they anchor within the actin meshwork, and mature into ciliary organizing centers known as basal bodies (v) elongation of one cilium from each basal body (Avasthi and Marshall, 2012; Dawe et al., 2007; Marcet et al., 2011; Pan et al., 2007; Pearson et al., 2007; Sorokin, 1968; Steinman, 1968; Vladar and Stearns, 2007). Recently, key regulators of multiciliogenesis have been identified, including the FOXJ1 and RFX (regulatory factor X) transcription factors and the geminin-related nuclear protein Multicilin (Blatt et al., 1999; Gomperts et al., 2004; Stubbs et al., 2008; Thomas et al., 2010; You et al., 2004; Yu et al., 2008). The reorganization of the apical actin cytoskeleton is an early event downstream of FOXJ1 expression, which requires activation of the small GTPase RhoA (Brody et al., 2000; Gomperts et al., 2004; Pan et al., 2007; You et al., 2004). Recent work has highlighted the importance of the interaction between Rho GTPase signaling and the planar cell polarity pathway to control the assembly of apical actin filaments, as well as the docking and the planar polarization of basal bodies (Park et al., 2008; Vladar and Axelrod, 2008). Proteins of the ezrin-radixin-moesin (ERM) family, which link actin to the cell membrane, require RhoA-dependent phosphorylation to interact with cortical actin (Bretscher et al., 2002; Hirao et al., 1996; Kotani et al., 1997; Shaw et al., 1998; Yonemura et al., 2002). In airway MCCs, ezrin and its interacting protein EBP50 are both selectively localized at the apical

membrane, through a FOXJ1-dependent mechanism (Bossinger and Bachmann, 2004; Gomperts et al., 2004; Huang et al., 2003; Pan et al., 2007).

The activity of Rho GTPases and their action on actin cytoskeletal dynamics are modulated by interaction with other GTPases, such as the Ras family member R-Ras (Ada-Nguema et al., 2006; Gawecka et al., 2010; Griffiths et al., 2011; Hodgkinson et al., 2007; Jeong et al., 2005; Self et al., 1993; Shang et al., 2011) or with Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), Rho GTPase-activating proteins (RhoGAPs) and Rho GDP-dissociation inhibitors (RhoGDIs) (Liu et al., 2012) (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Garcia-Mata et al., 2011; Scita et al., 2000).

Because the elaboration of functional motile cilia is exquisitely sensitive to the reorganization of the actin cytoskeleton, we reasoned that miR-449, a family of three microRNAs (449a, b and c) that was recently established as a conserved regulator of multiciliogenesis, may control one or more molecules associated with actin dynamics. MicroRNAs (miRNAs or miR) are a class of small single-stranded and non-coding regulatory RNAs that control many biological processes by repressing gene expression at a post-transcriptional level (Bartel, 2004; Filipowicz et al., 2008). Abnormal miRNA activity has been associated with many human pathological conditions including airway diseases (Giovannini-Chami et al., 2011). We previously demonstrated that miR-449 promotes centriole multiplication and multiciliogenesis, through the direct repression of Notch1 and its ligand Delta-like 1 (Marcet et al., 2011). However, miRNAs can target multiple transcripts and thereby modulate several pathways at the same time, including Rho GTPase signaling (Inui et al., 2010; Liu et al., 2012). We now show that miR-449 activity is also required for the establishment of the apical actin cytoskeleton, through the repression of small GTPase activity modulators such as R-Ras. Therefore, miR-449 appears as a global control system of multiciliogenesis, which governs several distinct steps of this complex physiological process.

Results & Discussion

Apical actin cytoskeleton reorganization during multiciliogenesis

Apical actin cytoskeleton formation was examined at several time-points during differentiation of primary cultures of human airway epithelial cells (HAECs) grown at an air-liquid interface (ALI) and in *Xenopus* embryonic epidermis (Marcet et al., 2011). Formation of the apical meshwork of filamentous actin (F-actin) was monitored directly by staining with fluorescent phalloidin and indirectly by immunostaining with anti-ezrin or anti-phospho-ERM antibodies. In human and *Xenopus*, the acetylated-tubulin positive MCCs displayed a strong enrichment of apical F-actin, which in HAECs was associated with submembranous *puncta* of ezrin (human: Fig. 1a; *Xenopus*: Fig. 1d). In HAECs, F-actin and ezrin colocalized with the γ -tubulin positive basal bodies (Fig. 1b). In both human and frog MCC precursors, apical actin meshwork formation and apical ezrin localization preceded cilia formation (data not shown). Reorganization of actin filaments involves cofilin, a ubiquitous G-actin binding factor, which catalyzes actin polymerization/depolymerization through severing activity and induction of dendritic nucleation and debranching (Bravo-Cordero et al., 2013). Only unphosphorylated cofilin can bind actin to promote its polymerization/depolymerization and phosphorylation-dependent cofilin inactivation is essential for cytoskeletal reorganization (Bravo-Cordero et al., 2013). In HAECs, phosphorylation of cofilin-1 first increased during early differentiation (polarization stage), and subsequently decreased when multiciliogenesis proceeded (Fig. 1c). In parallel, we noticed an enrichment of apical ezrin staining in MCCs (Fig. 1a,b) together with an increased level of the ERM binding protein EBP50 (Fig. 1c). These observations confirmed the formation of an apical actin web in MCCs in both models.

miR-449 controls apical actin cytoskeleton reorganization in vertebrate MCCs.

As miR-449 silencing was shown to prevent centriole multiplication and ciliogenesis in frog and human MCCs, we addressed whether they could also regulate the formation of the apical actin network in those cells. To invalidate miR-449 activity, we transfected HAECs with a cholesterol-conjugated antagomiR directed against miR-449a/b (AntagomiR-449a/b) and assessed MCCs differentiation. We also knocked down miR-449 in *Xenopus* MCCs by injecting a cocktail of morpholino-modified antisense oligonucleotides against miR-449a/b/c into prospective epidermis

at the 8-cell stage. Previously, we showed that miR-449 silencing does not affect cell viability in either HAECs or in frog embryos (Marcet et al., 2011). MiR-449 knockdown concomitantly suppressed multiciliogenesis and apical actin web formation in both HAECs and *Xenopus* embryonic epidermis (Fig. 2, a-d). In HAECs, miR-449 silencing caused the number of multiciliated cells to drop to $50.3 \pm 1.8\%$ of control, and the number of ezrin-positive cells to $42 \pm 18\%$ of control (Fig. 2, a-b). MiR-449 knockdown also qualitatively affected the apical actin meshwork revealed by a significant decrease in the number of ezrin-positive cells (Fig. 2, a-b). F-actin and cilia staining were both abolished or severely reduced in *Xenopus* epidermal MCCs injected with miR-449 morpholinos, at the onset of actin web assembly (st 16) and when cilia are fully developed (st 25) (Fig. S1 and Fig. 2, c-d). Thus, miR-449 is required for MCC apical actin meshwork formation in both HAECs and *Xenopus*. Stress fibers are thick and relatively stable actin filaments present in non-motile cells (Le Clainche and Carlier, 2008; Tojkander et al., 2012). Since proliferating HAECs contain stress fibers, but do not express miR-449, we tested the impact of miR-449 over-expression on the architecture of stress fibers in human alveolar A549 epithelial cells. MiR-449 overexpression led to an increase in stress fibers formation (Fig. 2e). Western blot analysis revealed an increase of ERM phosphorylation together with a decrease in phosphorylated-cofilin-1 in miR-449-transfected proliferating primary HAECs (Fig. 2f). These results are consistent with the regulatory role played by cofilin and phospho-ERM during actin cytoskeleton dynamics (Bravo-Cordero et al., 2013; Niggli and Rossy, 2008). Therefore, miR-449 is required for actin cytoskeleton remodeling in two independent models of vertebrate multiciliated cells.

miR-449 stimulates RhoA GTPase activity

RhoA-activated actin remodeling is a central regulatory event required for multiciliogenesis and airway epithelium differentiation (Horani et al., 2013; Pan et al., 2007). To assess the functional impact of miR-449 on RhoA activity, proliferating HAECs were transfected with miR-449 and differentiating HAECs were treated with the antagomiR-449. In both cases, the activity of RhoA was measured in a pull-down assay with Rhotekin, a protein that stoichiometrically interacts with GTP-bound Rho. As a positive control, proliferating HAECs were also incubated with calpeptin (Rho activator I, from Cytoskeleton, Denver, CO 80223, USA), an activator of Rho GTPase. In proliferating primary HAECs, miR-449 overexpression caused a ~50% raise of the level of active

RhoA-GTP, similarly to calpeptin (Fig. 2g). In differentiating HAECs, miR-449 silencing triggered the opposite effect, *i.e.* a significant decrease in RhoA activity (Fig. 2g). Furthermore, miR-449 slightly decreased Rac1,2,3 activity (Fig. S2c), without affecting Rac protein expression (data not shown). These data are consistent with the view that miR-449 control small GTPase pathways such as RhoA and Rac activity during multiciliogenesis in HAECs.

R-Ras and RhoGDI2 are direct targets of miR449

To determine the molecular mechanisms by which miR-449 control apical actin cytoskeleton reorganization, we looked for miR-449 mRNA targets that could regulate this process. We defined putative miR-449 targets as being repressed during MCC differentiation and after overexpression of miR-449. We thus analyzed at four time points (Pr, Po, EC, LC, corresponding to proliferating step at day 0, polarization step at day 7, the early multiciliogenesis step at day 14 and the late multiciliogenesis step at day 21 after setting up the cells in the air-liquid interface, respectively) differentiating HAECs from three donors as well as miR-449-transfected proliferating HAECs from five donors (GEO, GSE22147) (Marcet et al., 2011). Putative targets were then identified among down-regulated transcripts through the use of several miRNA target prediction tools (Le Brigand et al., 2010). This screen had previously allowed the identification of several cell cycle-related genes and *DLL1/NOTCH1* transcripts as *bona fide* miR-449 targets that contribute to the terminal differentiation of MCC precursors (Marcet et al., 2011). Here, we report two new putative targets, *RRAS* and *ARHGDIB*, which both code for components of the small GTPase signaling system involved in the Rho pathway and in actin cytoskeleton remodeling (Ota et al., 2004; Shang et al., 2011). Interestingly, *RRAS* and *ARHGDIB* were also recently found enriched in mouse airway non-ciliated cells (Hoh et al., 2012) (GSE42500).

RRAS encodes the R-Ras protein, a member of the superfamily of small GTPases related to Ras (Self et al., 1993). *ARHGDIB* encodes RhoGDI2. Despite the wide diversity in the Rho GTPases family, only three RhoGDIs have been identified in mammals, respectively encoded by the *ARHGDIA*, *ARHGDIB* and *ARHGDIG* genes (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Dovas and Couchman, 2005; Garcia-Mata et al., 2011). Interestingly, it has been recently shown that the miR449-related miR-34a can target RhoGDI2, promoting Rac1 activation and membrane translocation in non-small cell lung cancer cells (Duan et al., 2013). Although *in silico* prediction tools indicated that the three *ARHGD*I transcripts contain putative miR-449 binding sites in their

3'-UTR region, no variation of *ARHGDIA* expression levels was detected in HAECs during MCC differentiation or after miR-449 transfection (data not shown) and *ARHGDIG* was not detectable by real-time PCR in any tested conditions (data not shown).

In contrast, both *RRAS* and *ARHGDIB* were significantly expressed in HAECs (Fig. 3a). Levels of both *RRAS* transcript and R-Ras protein slightly decreased from the onset and throughout the phase of MCC differentiation (Fig. 3a,b). The level of *ARHGDIB* transcript decreased slightly at the onset of differentiation but rose again during the phase of multiciliogenesis (Fig. 3a). No significant variation of RhoGDI2 protein level was detected during MCC differentiation in HAECs (Fig. 3b). The reduction of *RRAS* and *ARHGDIB* levels at the beginning of MCC differentiation is concomitant with the increase of miR-449 (Fig. 3a-c). In explanted *Xenopus* embryonic epidermis, *rras* expression became detectable at neurula stage 16, dramatically increased between stages 17 and 20, and subsequently dropped (Fig. 3d). These stages encompass the differentiation of MCCs and the collapse of *rras* expression between stages 20 and 23 mirrors the increase in epidermal miR-449 expression (Fig. 3e). As no *arhgdib* expression was detected in *Xenopus* epidermis at any developmental stage, this target has not been further analyzed in this model (data not shown).

We then analyzed the expression of R-Ras and RhoGDI2 at a cellular resolution. In HAECs, immunohistochemistry revealed that both proteins were enriched in non-ciliated CD151+ basal cells (Haji et al., 2007; Marcet et al., 2011) compared to acetylated-tubulin positive MCCs (Fig. 4a). In *Xenopus* epidermis, real-time PCR and fluorescent *in situ* hybridization failed to reveal *rras* expression at stage 13, prior to the onset of MCC differentiation (data not shown). At stages 16 and 19, *rras* was mostly expressed by inner epidermal layer cells negative for the MCC marker *alpha-tubulin* (Fig. 4b).

To summarize, our data show that R-Ras and RhoGDI2 in HAECs and *rras* in *Xenopus* epidermis are excluded from the miR449-expressing MCC precursors during most of the multiciliogenesis process.

In order to confirm that the human *RRAS* and *ARHGDIB* transcripts are direct targets of miR449, we used a dual luciferase reporter assay in HEK293 cells. MiR-449 overexpression strongly reduced the relative luciferase activity of chimeric constructs containing the wild-type 3'UTRs of *RRAS* or *ARHGDIB*. This effect was abolished by mutations in the putative miR-449 binding sites (Fig. 4c). Thus, mutating the unique predicted binding site in the *ARHGDIB* 3'UTR was

sufficient to prevent repression by miR-449. Four miR-449 binding sites were predicted in the *RRAS* 3'UTR. Mutation of each individual binding site only partially blocked the effect of miR-449 overexpression, whereas combining mutations of all four sites led to a full reversion of the miR-449 repressive effect (Fig. 4c). Among the four miR-449 binding sites in the 3'UTR of *RRAS*, the strongest reversion was observed for the most 3' site, which is the only one conserved between human and *Xenopus* (Fig. 4c and S2). Finally, overexpression of miR-449 in proliferating HAECs strongly reduced the levels of *RRAS* and *ARHGDIB* transcripts (Fig. 4d) and proteins (Fig 4e-f). Thus, R-Ras and RhoGDI2 are *bona fide* targets of miR-449, including during HAEC differentiation. The increase in the level of *ARHGDIB* transcripts and the unchanged RhoGDI2 protein level observed at the end of HAEC differentiation (Fig 3a, b) are likely due to the predominance within HAEC cultures of *ARHGDIB* positive basal cells (Fig. 4a). *ARHGDIB* silencing using SiRNAs in differentiating HAECs strongly reduced RhoGDI2 protein level (Figure S2) without affecting either actin cytoskeleton reorganization or multiciliogenesis (data not shown?). This result suggests that miR-449 may target other undetermined and compensatory components involved in RhoGDI2 function and required for actin reorganization and multiciliogenesis. Altogether, the above data suggest that the control of *RRAS* expression by miR-449 may represent a conserved feature of multiciliogenesis in vertebrates. Since *RRAS* but not *ARHGDIB* was found expressed in the mucociliary epithelium of both human and *Xenopus*, we decide to focus our attention on the role of *RRAS* repression by miR-449 in MCCs.

The repression of R-Ras by miR-449 is necessary for apical actin reorganization and multiciliogenesis

To address the above question, we designed a target protection assay in which cholesterol-conjugated modified oligonucleotides (in HAECs) or morpholino oligonucleotides (in frog epidermis) compete the binding of miR-449 on the sites identified within the 3'UTRs of human and *Xenopus* *RRAS*. In human cells, the *RRAS* protector oligonucleotide effectively blocked the action of ectopic miR-449 on *RRAS* 3'UTR in luciferase assays (Fig. 5a). Importantly, the *RRAS* protector oligonucleotide increased endogenous R-Ras protein level in HAECs (Fig. 5b,c), suggesting that miR-449 does contribute to *RRAS* down-regulation in MCCs. In *Xenopus* explanted epidermis, morpholino-mediated inhibition of miR-449 activity, and morpholino-mediated protection of the unique miR-449 binding site in *rras* 3'UTR both led to an increase of

rras transcript levels (Fig. 5d). These assays indicated that *RRAS* transcripts are indeed specifically targeted by miR-449 in MCCs, in our two models. Incidentally, we have detected in human and in *Xenopus* a *RRAS*-related gene, *RRAS2*. However, *RRAS2* expression was unchanged during multiciliated cell differentiation or in response to miR-449 overexpression in HAECs (data not shown, see GEO, GSE22147). In *Xenopus*, *RRAS2* mRNA was detected at very low levels in epidermal explants, and contrarily to *rras*, its expression was altered neither by miR-449 silencing nor by *rras* protector morpholino (Fig. S1f).

In human (Fig. 5e,g), as well as in *Xenopus* (Fig. 5f,h), we noticed a strong reduction in the number of MCCs in response to protection of the *RRAS* transcript from miR-449. In HAECs, where cells transfected with the protector oligonucleotide can not be identified, apical but not junctional F-actin staining was lost in non-ciliated cells, consistent with an effect limited to miR-449 positive MCCs (Fig. 5e). Importantly, we show in *Xenopus* epidermis that actin cap formation and multiciliogenesis can be rescued when a morpholino designed to block R-Ras translation is co-injected with the *rras* protector morpholino (Fig. 5f,h). This assay confirmed that the maintenance of low levels of R-Ras activity within MCC precursors is essential for apical actin cap formation and multiciliogenesis.

Intriguingly, *RRAS* silencing using SiRNAs or morpholinos had no significant effect on RhoA and Rac activities (Fig. S2) but was by itself sufficient to strongly affect apical actin reorganization and multiciliogenesis in both species (Fig. 5c, 5e-h).-This could be due to the fact that *RRAS* silencing in non-ciliated cells may secondarily impair MCC differentiation in a Rho independent manner, as suggested elsewhere in another context (Dubaisi and Papalopulu, 2011). An alternative but not exclusive explanation could be that *RRAS* activity within MCC precursors must be kept low, but not totally suppressed. In particular, as experimental *RRAS* silencing had to be performed before the onset of multiciliogenesis, it remains possible that *RRAS* activity is required at earlier steps (proliferation, migration or polarization) of the MCC differentiation process. At a later step, the repression of *RRAS* by miR-449 is important for apical actin network assembly and multiciliogenesis in human and frog MCCs.

Some works indicated that R-Ras could interact with Filamin A, a non-muscle F-actin cross-linking protein involved in epithelial cell shape, actin cytoskeleton remodeling and primary cilia formation (Adams et al., 2012; Gawrecka et al., 2010; Griffiths et al., 2011; Nakamura et al., 2002; Tu et al., 2003). Whether the silencing of R-Ras by miR-449 causes the modulation of

Filamin A function in MCCs will be the focus of future investigations. Furthermore, R-Ras activity has been shown to be increased by Notch pathway activation (Hodkinson et al., 2007). Previously, we have demonstrated that miR-449 repressed Notch signaling during vertebrate multiciliogenesis (Marcet et al., 2011). We could hypothesize that in addition to the direct inhibition of *RRAS* transcripts by miR-449, R-Ras activity might also be inhibited through miR-449-induced Delta-Notch repression.

In conclusion, the data presented here show that miR-449 favors the assembly of the apical actin cytoskeleton in differentiating mammalian and amphibian MCCs, thus uncovering a new level of control of miR-449 on the process of multiciliogenesis in vertebrates. This study illustrates how a single microRNA family can coordinate complex cellular processes through the control of multiple targets.

Materials & Methods

Subjects/tissue samples

Inferior turbinates or nasal polyps were from patients who underwent surgical intervention for nasal obstruction or septoplasty (provided by Pr Castillo, Pasteur Hospital, Nice, France or by Epithelix Sàrl, Genova, Switzerland). The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the French Public Health Code and written consent from the patients.

Isolation and culture of human airway epithelial cells

Primary HAEC cultures were performed according to (Marcet et al., 2011). Experiments were conducted on cultures with transepithelial electrical resistance above 500 ohm/cm².

***Xenopus* injections**

Eggs obtained from NASCO females were fertilized in vitro, dejellied, cultured and injected as described (Marcet et al., 2011). cRNAs were generated with the Ambion mMessage Machine kit. pCS105/mGFP-CAAX (a gift from C. Chang, University of Alabama at Birmingham, USA) was linearized with AseI and cRNA was synthesized with Sp6 polymerase as previously described (Marcet et al., 2011). All injections were done at least twice.

Immunocytochemistry

Human : Fresh cultures of ALi-D21 (LC) HAECs sections were used for detection of acetylated-tubulin, ezrin, actin (phalloidin), and nuclei as described in (Marcet et al., 2011). Cells were fixed (4% paraformaldehyde, 15 min, 4°C), rinsed (PBS-glycine 0.1M, 10 min) and permeabilized (0.1% Triton X-100, 5 min). Only for centrin-2 immunostaining, cells were fixed with methanol (10min, -20°C). Fixed cells were blocked 1h in 3% BSA and incubated for 1h at room temperature with primary antibodies or overnight at 4°C with the following antibodies. Then, cells were incubated for 1h with appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor®, 1:500, Invitrogen), nuclei were stained with DAPI (300 nM, Invitrogen) and when indicated F-Actin were stained with Alexa Fluor® 594 Phalloidin (1U/staining). Stained cells were mounted with ProLong® Gold antifade reagents (Invitrogen, Life technologies) and examined with Leica SP5 confocal imaging system, Olympus FV10i.

Xenopus : For F-actin staining embryos were fixed in 4% formaldehyde/PBT 1h at 4°C and stained with phalloidin-Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 1:40) for 4 hours at room temperature. For immunostaining, embryos were fixed in MEMFA (0.5M MOPS, pH7.4, 100mM EGTA, 1mM MgSO₄, 3.7% Formaldehyde). Whole-mount embryos or sections were blocked in 15% goat serum. The following primary antibodies were used: mouse anti-acetylated-tubulin (Sigma, 1:500, Sigma), chicken anti-GFP (Aves, 1:500). After washing in PBT, sections or whole-mount embryos were incubated with the appropriate secondary antibody: anti-chicken Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen), anti-mouse Alexa Fluor 555 (1:500, Invitrogen) or anti-mouse Alexa Fluor 647 (all from Invitrogen, 1:500). Epidermis fragments were peeled from embryos at stages 20, 25 and mounted on a glass coverslip with fluoromount (Diagnostic BioSystem).

Western Blot and small GTPases activity measurement

Primary HAECs cells were harvested by scraping in RIPA lysis Buffer (Thermo Scientific Pierce), cleared by centrifugation. Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific) and equivalent amounts of protein were resolved on SDS polyacrylamide gels using Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System following manufacturer's instructions. Proteins were transferred to PVDF membranes and analyzed by immunoblotting with appropriate primary antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies (1/5000, Dako). Immunoreactive bands were detected using immobilon ECL kit (Merck Millipore) on LAS-3000 imager (Fujifilm).

Small GTPases activity assay

The activation of RhoA and Rac1,2,3 were evaluate by the GST pulldown with recombinant proteins GST-Rhotekin-RBD (Merck Milipore) and PAK-1 PBD (Merck Millipore), respectively. HAECs were seeded on type-I collagen-coated surface, miRNA mimics and siRNA were transfected for 72h. Cells were lysed in cell lysis buffer (50mM Tris pH 7.5, 10mM MgCl₂, 0.5M NaCl, and 2% Igepal) containing a proteinase inhibitor cocktail, lysate were cleared by centrifugation and immediately quantified using BCA assay kit. Approximately 400 µg of total proteins were incubated with the GST fusion protein at 4°C for 30 min. Supernatants were then incubated with Pierce Glutathione Magnetic Beads for 30 min at 4°C, and washed 3 times with wash buffer (25 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl) using magnetic rack. Samples

and pull down were resuspend in loading buffer and blotted using Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System following manufacturer's instructions.

Total RNA extraction

Human : Automated total RNA extraction were performed using QIAcube and miRNeasy kit from Qiagen according manufacturer's instructions. Total RNAs were quantified using NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and integrity of samples (RIN > 8) were evaluated using RNA nano-chips and Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies).

Xenopus : Total RNAs were isolated from animal caps dissected at stages 10 to 11 and cultured in MBS (880mM NaCl, 10mM KCl, 8.2mM MgSO₄, 24mM NaHCO₃, 100mM Hepes pH7.4, 4.1mM CaCl₂, 3.3mM Ca(NO₃)₂). Twenty explants for each sample (stages 14 or 25) were collected for RNA extraction. Total RNAs were isolated using the RNAeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and quantified using NanoDrop Spectrophotometer. cDNAs were synthesized using iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad).

Quantitative RT-PCR

Human : Real-time PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Assay and TaqMan® MicroRNA Assay (Life technologies) on a Lightcycler 480 (Roche) according to manufacturer's instructions. Expression levels of mature microRNAs and RNA messenger were calculated using the 2-deltaCT method, using respectively RNU44 and UBC as endogenous controls.

Xenopus : Primers were designed using Primer-BLAST Software. PCR reactions were carried out using SYBRGreen on a CFX Biorad qPCR cyclers. All experiments were repeated at least twice on separate injections and the RT-qPCR was performed in triplicate. The relative expression of *RRAS* was normalized to the expression of the housekeeping gene *ornithine decarboxylase* (ODC). The RT-qPCR *RRAS* primers are as follows: Forward: 5'-gtaaccaaagaggaagcgctca-3'; Reverse: 5'-ggatgacacaaggcaactttt-3'.

MiR-449 silencing and target protection experiments

Human : 3'- cholesterol linked 2'-O-Methyl miR-449a/b antisense oligonucleotide (antagomiR), 5'- *c₃u₅c₃uucaacacugccacau₃u₅u*-Chol-3', *ARHGDIB* protector oligonucleotide 5'-

a_sa_sa_saaggcaguguuuucugug_sa-Chol-3' and *RRAS* protector oligonucleotide 5'-*c_sg_su_sggcagugacauuuuuuu_su_sa*-Chol-3' (phosphorothioate bonds are indicated by subscript 's') were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgique). miR-449 antagomiR targets *Homo sapiens* miR-449a (full match) and miR-449b with one mismatch. The *ARHGDIB* and *RRAS* protectors are complementary antisense oligonucleotides targeting the conserved miR-449 binding site of the human *Arhgdib* and *RRAS* 3'-UTR, respectively. Negative control was the Clear-miR(tm) (5'-c_sa_su_sc_sgucg_saucg_suagc_sg_sa-Chol-3') from Eurogentec. AntagomiR and protectors were used as previously described (Marcet et al., 2011).

Xenopus : Morpholino antisense oligonucleotides (MOs): MO against miR-449 (GeneTools, LLC): miR-449a MO, 5'-accagtaacattacactgcct-3'; miR-449b MO, 5'-gccagctaaaactacactgcct-3'; miR-449c MO, 5'-acagccagctagcaagtgcactgcc-3'; MO control, 5'-tgcacgtttcaatacagaccgt-3'. A mixture of 10 ng of each miR-449 MO was injected in one animal-ventral blastomere at the 8-cell stage. Protector MO directed against miR-449-binding sites in *rras* 3'-UTR: 5'-gttgcaatgttagtgcaattcgtt-3'. 5.7 or 7.5 ng of protector MO was injected in one animal-ventral blastomere at the 8-cell stage. Morpholino oligonucleotide blocking the translation of *rras*: 5'-gctccttggaactcatagtcgtgc-3'. 15 or 25 ng of *rras* translation MO was injected in one animal-ventral blastomere at the 8-cell stage.

Ectopic expression of microRNAs/siRNAs

Cells were grown to 30 % confluency in proliferation medium on plastic, glass coverslip or on transwell® filters. Cells were then transfected with synthetic negative control miRNA (miR-Neg, Ambion) or synthetic miR-449a/b miRNAs (Ambion) (10 nM final concentration). Total RNAs or proteins were extracted, or immunostaining performed, from 24h to 72h later. For siRNA experiments in differentiating HAECs, cells were then transfected with siRNAs against human *RRAS* or *ARGHDIB* transcripts or negative control siRNAs (Stealth RNAi™ siRNAs, Life Technologies) (20 nM final concentration) using Lipofectamine RNAi Max Reagent (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) according manufacturer's instructions. The next day, an additional transfection was performed using the same procedure, before HAEC differentiation was induced in ALi the third day. Finally, HAECs were harvested for western blot analyses or processed for immunofluorescence experiments after 7, 14 and 21 days of culture in ALi.

Plasmid constructs and Luciferase measurements

Sequence from the wild-type or mutants 3'-UTR of *ARHGDIB* and *RRAS* were synthesized (gBlocks® Gene Fragments, Integrated DNA Technologies) and cloned into psiCheck2 vector (Promega). For mutated 3'-UTRs, three bases of each seed region were changed by complementary bases. PiCheck2 constructions were co-transfected with synthetic microRNAs mimics (Ambion, Applied Biosystems) with or without antagomiRs or antisense protectors into HEK293T cells, and luciferase activity was measured using the dual reporter luciferase assay kit (Promega), according to the manufacturer's protocol.

List of Antibodies used

Sp.	Target	Réf./clone	Manufacturer	IB	IF
Ms	Acetylated-Tubulin	6-11B-1	Sigma-Aldrich		1/1000
Ms	γ -Tubulin	GTU-88	Sigma-Aldrich		1/1000
Ms	β 4-Tubulin	ONS.1A6	Sigma-Aldrich		1/400
Ms	CD151	14A2.H1	BD biosciences		1/100
Rb	AKAP14	SAB4500605	Sigma-Aldrich		1/400
Rb	centrin-2	N17-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc.		1/500
Rb	R-Ras	C-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/1000	1/400
Rb	RhoGDI2	ab88317	Abcam	1/500	1/200
Rb	Ezrin	07-130	Merck Millipore	1/1000	1/100
Rb	P-ERM	41A3	Cell Signaling Technology	1/1000	1/100
gt	actin	I-19	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/5000	
gt	Hsp60		Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/5000	
Rb	RhoA	67B9	Cell Signaling Technology	1/1000	
Rb	Rac1,2,3	2465	Cell Signaling Technology	1/1000	
Rb	P-Cofilin 1	(hSer3)-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1/500	
Rb	NHERF1	A310	Cell Signaling Technology	1/1000	
HRP conjugate anti-Ms/Rb/Gt			Dako	Lot Dependant	

In situ hybridization on *Xenopus* embryos

Whole-mount in situ hybridization was done as described previously (Marchal et al., 2009). *RRAS* Digoxigenin-labelled sense and antisense riboprobes (Anna/Andrea please add clone

number and provider) and fluorescein-labelled antisense α -tubulin riboprobe (Deblandre et al. 1999) were generated from linearized plasmids using RNA-labeling mix (Roche). Locked Nucleic Acid (LNA) antisense probe against the mature form of miR-449a was described previously (Marcet et al., 2011). For fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on sections, embryos were fixed in MEMFA 2h at room temperature or overnight at 4°C, stored in methanol at least 24h at -20°C, rehydrated and washed in triethanolamine (0.1M)/acetic anhydrid. Embryos were then transfered in successive sucrose washes from 5% to 30% sucrose in PBT. They were then embedded in O.C.T Compound (VWR Chemicals Prolabo), flash frozen and 12 μ m thick sections were prepared with a CM3050S Leica cryostat. Slides were kept at -80°C at least overnight before FISH. FISH was carried out using Tyramide Signal Amplification – TSA TM Plus Cyanine 3/Fluorescein System (PerkinElmer). Before hybridation, and after Proteinase K digestion (3min at 2ug/ml), endogenous peroxydase activity was blocked in a bath of H₂O₂ 3% in PBS for 20 min. Sections were hybridized with a mixture of Digoxigenin- and Fluorescein-labelled probes 40 ng each) overnight at 60°C. Following washes (2 times with 2% SSC / 0.1% Chaps at 60°C ;2 times with 0.2% SSC / 0.1% Chaps at 37°C), the Digoxigenin-labelled probe was revealed first through incubation with a mouse anti-DIG antibody conjugated to horseradish peroxidase (POD) (Roche, 1:500), followed by incubation in Cy3 fluorophore amplification reagent (1/50 in the TSA diluent during 10 min). This reaction was then blocked in a bath of 2% H₂O₂ during 20 min. Next, the fluorescein-labelled probe was revealed with a mouse anti-fluorescein POD-conjugated antibody (Roche, 1:500), followed by incubation in Cy5 fluorophore amplification reagent (1/50 in the TSA diluent during 10 min). This second reaction was blocked in a bath of 2% H₂O₂ during 20 min. Following double FISH, immunostaining with anti-GFP antibody was performed, and slides were processed for confocal imaging.

Confocal microscopy in *Xenopus*

Flat-mounted epidermal explants were examined with a Zeiss LSM 780 confocal microscope. Three-colour confocal z-series images were acquired using sequential laser excitation, converted into single plane projection and analyzed using ImageJ software.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNRS, Région PACA, CG06 and by grants from ANR (MERCi, COMMIT, MITHRA), Vaincre la Mucoviscidose, FRM (DEQ20130326464), ARC and INCa. We thank V. Magnone, G. Rios, S. Fourré, K. and LeBrigand from the IBISA Functional Genomics Platform, Sophia-Antipolis, for help with transcriptome analyses and bioinformatics, F. Brau and J. Cazareth, for cellular imaging, R. Waldmann and B. Mari for helpful discussions. This work is the object of a CNRS patent N°09/03723.

Abbreviations List

Multiciliated cells (MCCs); ezrin-radixin-moesin (ERM); Rho GDP-dissociation inhibitors (RhoGDIs); MicroRNAs (miRNAs or miR); miR-449a, miR-449b and miR-449c (miR-449); human airway epithelial cells (HAECs); air-liquid interface (ALI); filamentous actin (F-actin); Morpholino(s) (MOs); protector antisense (Po); Proliferating step (Pr) ; polarization step (Po); early ciliogenesis step (EC); late ciliogenesis step (LC)

Legends

Figure 1

Apical actin cytoskeleton in vertebrate MCCs. (a) ALi-day 28 HAECs were stained for ezrin (using anti-ezrin antibody in green in panels a1, a5), F-actin (using phalloidin in red in panels a2, a6) and cilia (using anti-acetylated tubulin antibody in magenta in panels a3, a7). Nuclei are stained with DAPI (blue in panel a6). Panels a5-8 are orthogonal views (z slices) of a1-4. In acetylated tubulin-positive MCCs (white arrowheads), F-actin is apically enriched (a2, a6) and colocalizes with ezrin (a1, a5 and a4, a8). (b) γ -tubulin-positive basal bodies (magenta in panels b3, b4) colocalize with ezrin (b1, b4) and apical F-actin (b2, b4). Images were acquired using the Fv10i confocal imaging system (Olympus) with 60X oil immersion objective. (c) Dynamics of Cofilin1 phosphorylation and EBP50 expression during HAEC differentiation are indicative of actin remodeling (Pr: proliferating HAECs; Po: polarization stage, ALi days 5-10; EC: early ciliogenesis, ALi days 14-20; LC: late ciliogenesis, from ALi days 21). (d) In the epidermis of stage 25 *Xenopus* embryos, F-Actin (using phalloidin in red in panel d1) is apically enriched in acetylated tubulin-positive MCCs (magenta in panel d2-d3).

Figure 2

MiR-449 knockdown inhibits apical actin remodeling in MCCs and stimulates RhoA activity. (a) Differentiating HAECs were chronically treated with control antagomiR (Antago-Neg; panels a1-a4) or anti-miR-449a/b (Antago-449; panels a5-a8) and stained for F-actin (panels a1, a5), ezrin (panels a2, a6) and acetylated-tubulin (panels a3, a7), at ALi day 21. MiR-449 inhibition affects F-actin apical enrichment (a5), ezrin apical localization (a6) and multiciliogenesis (a7). (b) The histogram indicates the relative rate of multiciliated cells and apical ezrin positive cells per field in each experimental condition (20 fields per condition in triplicate). Data are means \pm s.d. from 9 and 3 donors for MCCs and ezrin positive cells, respectively (***, $p < 0.001$, Student's t-test). (c) 8 cell-stage *Xenopus* embryos were injected in the epidermis precursor blastomeres with a mixture of synthetic mRNA coding for membrane-bound GFP (GFP-CAAX) and control morpholinos (CTR-MO; panels c1-4) or morpholinos against miR-449 (449-MOs; panels c5-8) then stained at stage 25 for F-actin (panels c1, c5) and acetylated-tubulin (panels c3, c7). GFP fluorescence visualizes the injected clone (panels c2, c6).

Knockdown of miR-449 affects F-actin apical enrichment (c5) and multiciliogenesis (c7). (d) The histogram indicates the percentage of injected cells (positive for GFP fluorescence) that develop cilia or apical actin cap in controls (Stage 24+25 : n= 5 fields/583 injected cells) and in miR-449 morphants (Stage 24+25 : n=8 fields/625 injected cells; P value_{st.24+25} = 0.0087, Mann-Whitney test with two-tailed P value). (e) Immunostaining of human alveolar A549 epithelial cells cells were grown on glass coverslips for 72h, then transfected with synthetic control negative miRNA (miR-Neg) or synthetic miR-449a (miR-449a) for 48h and stained for F-Actin (phalloidin in red) and nuclei (DAPI in blue). Ectopic expression of miR-449a mimics leads to the formation of thick bundles of actin. (f) MiR-449 overexpression in proliferating HAECs for 72h stimulates the phosphorylation of ERM and inhibits the phosphorylation of Cofilin-1. Phosphorylated protein levels were normalized with non-phosphorylated ERM or cofilin and with an antibody against HSP60 as an internal control. Normalized fold changes are indicated beneath the corresponding bands. Experiments were representative of three donors. (g) Proliferating HAECs were transfected for 72h with miR-Neg or miR-449a then incubated for 2h with the RhoA Activator. RhoA activation was measured in a GST-Rhotekin pull-down assay. HAECs at ALi day 7 were treated with antago-449 or antago-Neg, then RhoA activation was measured. The histogram indicates the relative RhoA activation in each experimental condition normalized to the control set to 100%. Data represent the mean and s.d of at least 3 independent experiments (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$, not significant (n.s), Student's t-test).

Figure 3

Expression of R-Ras and RhoGDI2 during vertebrate multiciliogenesis. (a) Expression levels of *RRAS* and *ARHGDI2* transcripts during HAEC differentiation. Transcripts levels were normalized with *UBC* transcript as an internal control (Pr: proliferating HAECs; Po: polarization stage, ALi days 5-10; EC: early ciliogenesis, ALi days 14-20; LC: late ciliogenesis, from ALi days 21). (b) Expression levels of R-Ras and RhoGDI2 protein during HAEC differentiation. β -actin was used as an internal control. (c) Relative abundance of miR-449a in differentiating HAECs. MicroRNA levels were normalized with *rnuc44* as an internal control. (d) Real-time RT-PCR of *rras* transcripts in *Xenopus* epidermis indicate that *rras* expression increases between stages 9 to 19 then is strongly downregulated from stage 19 to 25. Transcript levels of *RRAS* were normalized against *Odc* transcript. (e) Transcript levels of *RRAS* decrease concomitantly with the

induction of miR-449 expression. Transcript levels of *RRAS* were normalized against *Odc* transcript as an internal control, and miR-449 expression was normalized with U6 as an internal control. Error bars denotes standard deviation from three independent experiments.

Figure 4

Expression of R-Ras and RhoGDI2 is controlled by MiR-449. (a) Cytospin of dissociated differentiated HAECs (panels 1-5) and HAECs cultured at ALi day 28 (panel 6) were labeled to identify the specific cell type localization of R-Ras and RhoGDI2 proteins. R-Ras (green; panels 2,4) and RhoGDI2 (green; panels 3, 5, 6) were enriched in basal cells positive for CD151 (red; panels 1-3), with respect to MCCs positive for acetylated-tubulin (magenta; arrowheads in panels 4-6). Nuclei are stained with dapi (blue; panels 1-5). (b) Fluorescent *in situ* hybridization on sections of *Xenopus* embryonic epidermis at stages 16 and 19 reveals that the *rras* mRNA (green; panels b1, 2) is largely excluded from MCC precursors labelled by the α -tubulin mRNA (red; panels b1, 2). (c) Specific interaction between miR-449a/b and the 3'-UTRs of *RRAS* and *ARHGDI2* mRNAs was confirmed using luciferase reporter assay on constructs carrying either the wild-type or mutants 3'-UTR-binding site for miR-449. All experiments were done in triplicate; values were normalized with the internal Renilla luciferase control. (d) Real-time RT-PCR reveals a strong reduction in *RRAS* and *ARHGDI2* transcript levels following miR-449 but not miR-Neg overexpression for 24h or 48h in proliferating HAECs. Transcript levels were normalized against the *UBC* gene. Data represent the mean and s.d. of at least 3 independent experiments (***, $p < 0.001$, Student's t-test) (e) The expression levels of RhoGDI2 and R-Ras protein decrease after miR-449 overexpression in proliferating HAECs for 72h. β -actin is used as an internal control. (f) Quantification of RhoGDI2 and R-Ras protein level in response to miR-449 overexpression. Data are means \pm s.d. from at least three independent experiments (***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$; not significant (n.s), Student's t-test).

Figure 5

Inhibiting the interaction between *RRAS* mRNA and miR-449 affects multiciliogenesis and apical actin cytoskeleton reorganization. (a) Antago-449a/b and miR-449::*RRAS* protector oligonucleotides specifically prevent miR-449 binding on *RRAS* 3'UTR. miR-449a transfection in HEK293 cells strongly reduced relative luciferase activity of wild-type 3'-UTR chimeric

constructs of *RRAS*. This effect was strongly blocked by antago-449a/b or miR-449::*RRAS* protector co-transfection, whereas it was not significantly affected by co-transfection with negative controls (antago-Neg or protector-Neg). Values were normalized to the internal *Renilla* Luciferase control. (b) Modulation of R-Ras protein level induced by miR-449::*RRAS* protection (PO-*RRAS*) in HAECs in comparison to treatment by negative control (PO-Neg). Protein levels were normalized with an antibody against HSP60 as an internal control. R-Ras protein level was increased by miR-449::*RRAS* protection, indicating the specificity of PO-*RRAS* and that *RRAS* is a true miR-449 target in human. Experiments were representative of three donors. (c) Modulation of R-Ras protein level induced by silencing of *RRAS* by SiRNA Si-*RRAS* in HAECs in comparison to treatment by negative control (Si-Neg). Protein levels were normalized with an antibody against HSP60 as an internal control. R-Ras protein level was strongly decreased by Si-*RRAS*, indicating the specificity of the SiRNA against *RRAS*. (d) Real-time RT-PCR expression of *rras* in *Xenopus* embryos injected with MO-Neg, MO-PO-*rras*, or 449-MOs. The expression of *rras* is increased in both 449-MOs and MO-PO-*rras*, indicating that *rras* is a true miR-449 target in *Xenopus*. Transcripts levels of *rras* were normalized against *Odc* transcript as an internal control. Error bars denotes standard deviation from three independent experiments. (e) Differentiating HAECs were chronically treated with negative antagomiR/Protector (Antago-Neg/Po-Neg), anti-miR-449a/b (Antago-449) or with an oligonucleotide protecting the miR-449 binding site on *RRAS* (Po-*RRAS*). Alternatively, HAECs were transfected at seeding time with a negative siRNA (Si-Neg) or a siRNA against *RRAS* (Si-*RRAS*). Cilia are stained with anti-acetylated-tubulin antibody (magenta) and F-actin with phalloidin (red). Protecting the *RRAS* mRNA from interaction with miR-449 leads to a decrease in MCC differentiation similar to that observed after inhibition of miR-449 activity. A decrease in the number of MCCs is also observed following inhibition of *RRAS* with Si-*RRAS*. (c) The histogram indicates the number of MCCs per field in each experimental condition (20 fields per condition in triplicate). Data are means \pm s.d. from 2 donors. (b,d) 8 cell-stage *Xenopus* embryos were injected in the epidermis precursor blastomeres with a mixture of synthetic mRNA coding for membrane-bound GFP (GFP-CAAX) and CTR-MO (CTR-Neg), 449-MOs, a morpholino protecting *rras* against binding by miR-449 (MO-Po-*rras*) or a morpholino blocking the translation of *rras* (MO-ATG *rras*). GFP-CAAX (green) labels the injected cells, MCCs are stained with an anti acetylated tubulin antibody (red). Protecting the *rras* mRNA from interaction with miR-449 results in a loss of

MCCs. This phenotype is rescued when the translation of the protected *rras* mRNA is blocked by coinjection of MO ATG *rras*. (d) The histogram indicates the percentage of injected cells (positive for mGFP) that develop proper cilia. CTR-Neg, n=10 embryos/413 injected cells; MO-PO-*rras*, n=8 embryos/350 injected cells; MO-ATG *rras*, n=8 embryos/290 injected cells; MO-PO-*rras* + MO-ATG *rras* n=9 embryos/395 injected cells (***, P=0.009 and P<0.0001, and **, P=0.0016, Mann-Whitney test).

Figure S1

(a,b) MCCs were stained for acetylated tubulin (magenta) and F-actin (red) in uninjected *Xenopus* embryos at stage 16 (a1-a3) and stage 20 (b1-b3) and in embryos in which the epidermis precursor blastomeres were injected with a mixture of mGFP (green) and CTR-MO (panels a4-7 and b4-7) or 449-MOs (panels a8-11 and b8-11). (c) The histogram indicates the percentage of injected cells (positive for GFP fluorescence) that develop cilia in controls (Stage 19+20 = 5 fields/672 injected cells) and in miR-449 morphants (Stage 19+20 = 8 fields/467 injected cells; P value $_{st.19+20} = 0.0281$, Mann-Whitney test with two-tailed P value). (d) Whole mount *in situ* hybridization with *rras* probe in *Xenopus* embryos at different developmental stages as indicated on panels 1-6. (e) Whole mount *in situ* hybridization with a LNA probe against miR-449 in *Xenopus* at different developmental stages. (f) Real-time RT-PCR expression of *rras2* in *Xenopus* embryos injected with MO-Neg, MO-PO-*rras*, or 449-MOs. Contrary to *rras*, *rras2* expression is not affected in either 449-MOs or MO-PO-*rras*, indicating that only *rras* is a true miR-449 target in *Xenopus*. Transcript levels of *rras2* were normalized against *Odc* transcript as an internal control. Error bars denotes standard deviation from three independent experiments.

Figure S2

(a) MiR-449 binding sites located in the 3'-UTR of *Homo sapiens* (hsa) or *Xenopus laevis* (xla) *RRAS* mRNA were identified *in silico* using "microcible" miRNA target prediction tool available on our laboratory website (www.microrray.fr). (b) Modulation of RhoGDI2 and R-Ras protein level induced by miR-449 overexpression in proliferating HAECs. Protein levels were normalized against β -Actin as an internal control and normalized fold changes are indicated beneath the corresponding bands. Experiments were representative of three donors. (c) Rac activation was measured in proliferating HAECs in a pull-down assay with GST-PAK. miR-Neg, miR-449a, Si-Neg, Si-*ARHGDIB* or Si-*RRAS* were transfected for 72h. RhoA activation was measured in differentiating HAECs treated with antago-449 or antago-Neg after a week of air-liquid interface. The histogram indicates the relative Rac activation in each experimental condition normalized to the control set to 100%. Data represent the mean and s.d of two independent experiments. (d) RhoA activation was measured in proliferating HAECs using pull-down with GST-Rhotekin-RBD. miR-Neg, miR-449a, Si-Neg, Si-*ARHGDIB* or Si-*RRAS* were transfected for 72h. The histogram indicates the relative RhoA activation in each

experimental condition normalized to the control set to 100%. Data represent the mean and s.d of at least 3 independent experiments (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, * $p < 0.05$, not significant (n.s), Student's t-test).

References

- Ada-Nguema, A.S., H. Xenias, J.M. Hofman, C.H. Wiggins, M.P. Sheetz, and P.J. Keely. 2006. The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLCepsilon. *J Cell Sci.* 119:1307-1319.
- Adams, M., R.J. Simms, Z. Abdelhamed, H.R. Dawe, K. Szymanska, C.V. Logan, G. Wheway, E. Pitt, K. Gull, M.A. Knowles, E. Blair, S.H. Cross, J.A. Sayer, and C.A. Johnson. 2012. A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Hum Mol Genet.* 21:1272-1286.
- Avasthi, P., and W.F. Marshall. 2012. Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation.* 83:S30-42.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-297.
- Blatt, E.N., X.H. Yan, M.K. Wuerffel, D.L. Hamilos, and S.L. Brody. 1999. Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:168-176.
- Bossinger, O., and A. Bachmann. 2004. Ciliogenesis: polarity proteins on the move. *Curr Biol.* 14:R844-846.
- Bravo-Cordero, J.J., M.A. Magalhaes, R.J. Eddy, L. Hodgson, and J. Condeelis. 2013. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol.*
- Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:586-599.
- Brody, S.L., X.H. Yan, M.K. Wuerffel, S.K. Song, and S.D. Shapiro. 2000. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:45-51.
- Cardenas-Rodriguez, M., and J.L. Badano. 2009. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 151C:263-280.
- Dawe, H.R., H. Farr, and K. Gull. 2007. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci.* 120:7-15.
- DerMardirossian, C., and G.M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15:356-363.
- Dovas, A., and J.R. Couchman. 2005. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J.* 390:1-9.
- Duan, W., Y. Xu, Y. Dong, L. Cao, J. Tong, and X. Zhou. 2013. Ectopic expression of miR-34a enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells, partly by suppressing the LyGDI signaling pathway. *J Radiat Res.*
- Dubaissi, E., and N. Papalopulu. 2011. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Dis Model Mech.* 4:179-192.
- Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9:102-114.

- Fliegeauf, M., T. Benzing, and H. Omran. 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:880-893.
- Garcia-Mata, R., E. Boulter, and K. Burridge. 2011. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:493-504.
- Gawecka, J.E., G.S. Griffiths, B. Ek-Rylander, J.W. Ramos, and M.L. Matter. 2010. R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One.* 5:e11269.
- Giovannini-Chami, L., N. Grandvaux, L.E. Zaragosi, K. Robbe-Sermesant, B. Marcet, B. Cardinaud, C. Coraux, Y. Berthiaume, R. Waldmann, B. Mari, and P. Barbry. 2011. Impact of microRNA in normal and pathological respiratory epithelia. *Methods Mol Biol.* 741:171-191.
- Gomperts, B.N., X. Gong-Cooper, and B.P. Hackett. 2004. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci.* 117:1329-1337.
- Griffiths, G.S., M. Grundl, J.S. Allen, 3rd, and M.L. Matter. 2011. R-Ras interacts with filamin a to maintain endothelial barrier function. *J Cell Physiol.* 226:2287-2296.
- Hajj, R., T. Baranek, R. Le Naour, P. Lesimple, E. Puchelle, and C. Coraux. 2007. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells.* 25:139-148.
- Hayes, J.M., S.K. Kim, P.B. Abitua, T.J. Park, E.R. Herrington, A. Kitayama, M.W. Grow, N. Ueno, and J.B. Wallingford. 2007. Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Dev Biol.* 312:115-130.
- Hirao, M., N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, and S. Tsukita. 1996. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol.* 135:37-51.
- Hodkinson, P.S., P.A. Elliott, Y. Lad, B.J. McHugh, A.C. MacKinnon, C. Haslett, and T. Sethi. 2007. Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras. *J Biol Chem.* 282:28991-29001.
- Hoh, R.A., T.R. Stowe, E. Turk, and T. Stearns. 2012. Transcriptional program of ciliated epithelial cells reveals new cilium and centrosome components and links to human disease. *PLoS One.* 7:e52166.
- Horani, A., A. Nath, M.G. Wasserman, T. Huang, and S.L. Brody. 2013. ROCK Inhibition Enhances Airway Epithelial Basal Cell Proliferation and Lentivirus Transduction. *Am J Respir Cell Mol Biol.*
- Huang, T., Y. You, M.S. Spoor, E.J. Richer, V.V. Kudva, R.C. Paige, M.P. Seiler, J.M. Liebler, J. Zabner, C.G. Plopper, and S.L. Brody. 2003. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J Cell Sci.* 116:4935-4945.
- Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo. 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:252-263.
- Jeong, H.W., J.O. Nam, and I.S. Kim. 2005. The COOH-terminal end of R-Ras alters the motility and morphology of breast epithelial cells through Rho/Rho-kinase. *Cancer Res.* 65:507-515.
- Kotani, H., K. Takaishi, T. Sasaki, and Y. Takai. 1997. Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene.* 14:1705-1713.

- Le Brigand, K., K. Robbe-Sermesant, B. Mari, and P. Barbry. 2010. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics*. 26:3131-3132.
- Le Clainche, C., and M.F. Carlier. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*. 88:489-513.
- LeSimple, P., I. van Seuning, M.P. Buisine, M.C. Copin, M. Hinz, W. Hoffmann, R. Hajj, S.L. Brody, C. Coraux, and E. Puchelle. 2007. Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 36:296-303.
- Liu, M., F. Bi, X. Zhou, and Y. Zheng. 2012. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol*. 22:365-373.
- Marcet, B., B. Chevalier, G. Luxardi, C. Coraux, L.E. Zaragosi, M. Cibois, K. Robbe-Sermesant, T. Jolly, B. Cardinaud, C. Moreilhon, L. Giovannini-Chami, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, R. Waldmann, L. Kodjabachian, and P. Barbry. 2011. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol*. 13:693-699.
- Marshall, W.F. 2008. The cell biological basis of ciliary disease. *J Cell Biol*. 180:17-21.
- Nakamura, F., E. Osborn, P.A. Janmey, and T.P. Stossel. 2002. Comparison of filamin A-induced cross-linking and Arp2/3 complex-mediated branching on the mechanics of actin filaments. *J Biol Chem*. 277:9148-9154.
- Niggli, V., and J. Rossy. 2008. Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:344-349.
- Ota, T., M. Maeda, S. Suto, and M. Tatsuka. 2004. LyGDI functions in cancer metastasis by anchoring Rho proteins to the cell membrane. *Mol Carcinog*. 39:206-220.
- Pan, J., Y. You, T. Huang, and S.L. Brody. 2007. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J Cell Sci*. 120:1868-1876.
- Park, T.J., B.J. Mitchell, P.B. Abitua, C. Kintner, and J.B. Wallingford. 2008. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet*. 40:871-879.
- Pearson, C.G., B.P. Culver, and M. Winey. 2007. Centrioles want to move out and make cilia. *Dev Cell*. 13:319-321.
- Roy, S. 2009. The motile cilium in development and disease: emerging new insights. *Bioessays*. 31:694-699.
- Satir, P., and S.T. Christensen. 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol*. 69:377-400.
- Scita, G., P. Tenca, E. Frittoli, A. Tocchetti, M. Innocenti, G. Giardina, and P.P. Di Fiore. 2000. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J*. 19:2393-2398.
- Self, A.J., H.F. Paterson, and A. Hall. 1993. Different structural organization of Ras and Rho effector domains. *Oncogene*. 8:655-661.
- Shang, X., J.A. Cancelas, L. Li, F. Guo, W. Liu, J.F. Johnson, A. Ficker, D. Daria, H. Geiger, N. Ratner, and Y. Zheng. 2011. R-Ras and Rac GTPase cross-talk regulates hematopoietic progenitor cell migration, homing, and mobilization. *J Biol Chem*. 286:24068-24078.

- Shaw, R.J., M. Henry, F. Solomon, and T. Jacks. 1998. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 9:403-419.
- Sorokin, S.P. 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci*. 3:207-230.
- Steinman, R.M. 1968. An electron microscopic study of ciliogenesis in developing epidermis and trachea in the embryo of *Xenopus laevis*. *Am J Anat*. 122:19-55.
- Stubbs, J.L., I. Oishi, J.C. Izpisua Belmonte, and C. Kintner. 2008. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat Genet*. 40:1454-1460.
- Thomas, J., L. Morle, F. Soulavie, A. Laurencon, S. Sagnol, and B. Durand. 2010. Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol Cell*. 102:499-513.
- Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen. 2012. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*. 125:1855-1864.
- Tu, Y., S. Wu, X. Shi, K. Chen, and C. Wu. 2003. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 113:37-47.
- Vladar, E.K., and J.D. Axelrod. 2008. Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends Cell Biol*. 18:517-520.
- Vladar, E.K., and T. Stearns. 2007. Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *J Cell Biol*. 178:31-42.
- Yonemura, S., T. Matsui, and S. Tsukita. 2002. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci*. 115:2569-2580.
- You, Y., T. Huang, E.J. Richer, J.E. Schmidt, J. Zabner, Z. Borok, and S.L. Brody. 2004. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286:L650-657.
- Yu, X., C.P. Ng, H. Habacher, and S. Roy. 2008. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet*. 40:1445-1453.

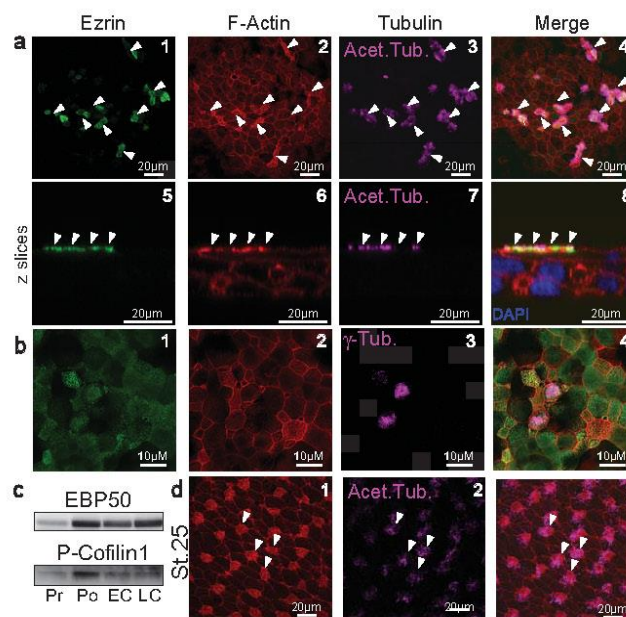


Figure 1
Apical actin cytoskeleton in vertebrate MCCs.

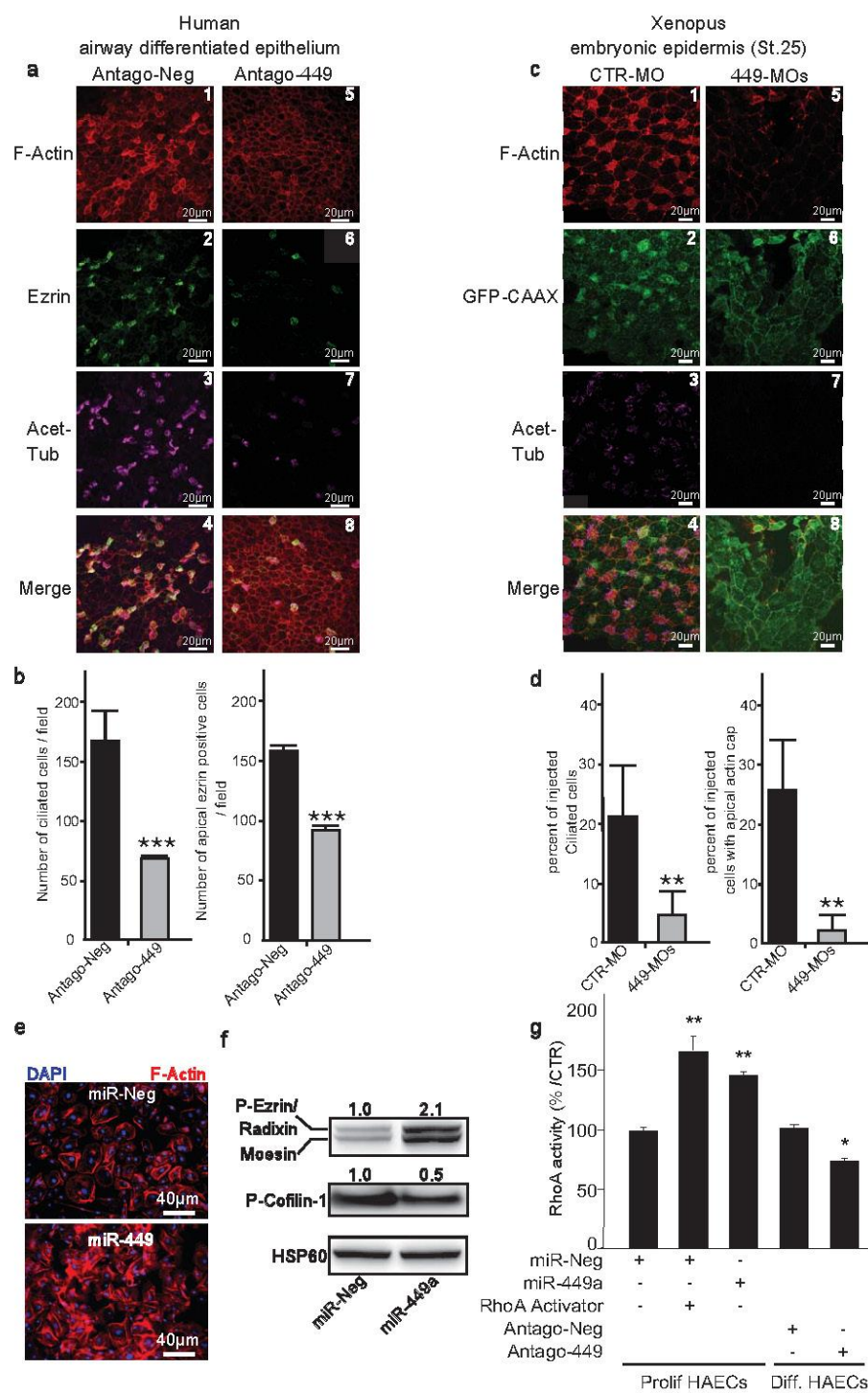


Figure 2

MiR-449 knockdown inhibits apical actin remodeling in MCCs and stimulates RhoA activity.

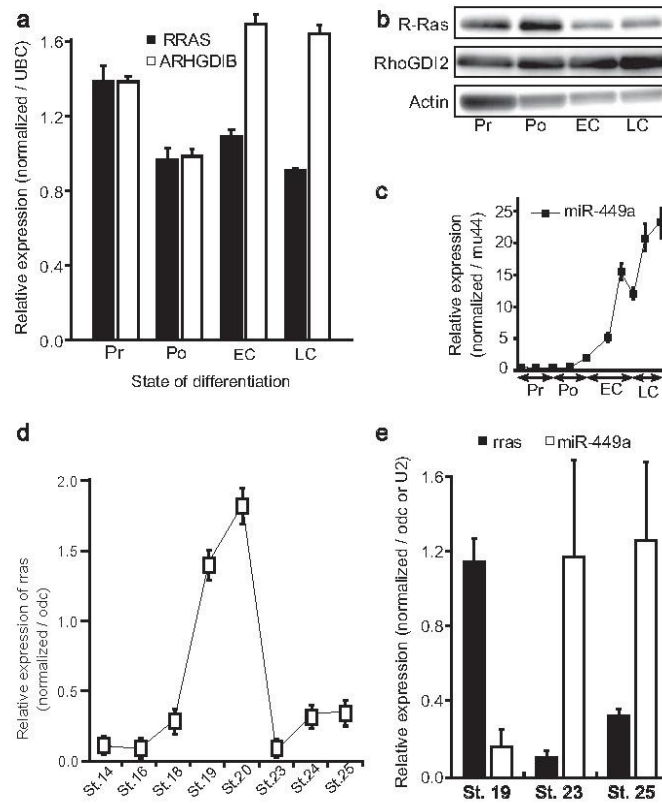


Figure 3
Expression of R-Ras and RhoGDI2 during vertebrate multiciliogenesis.

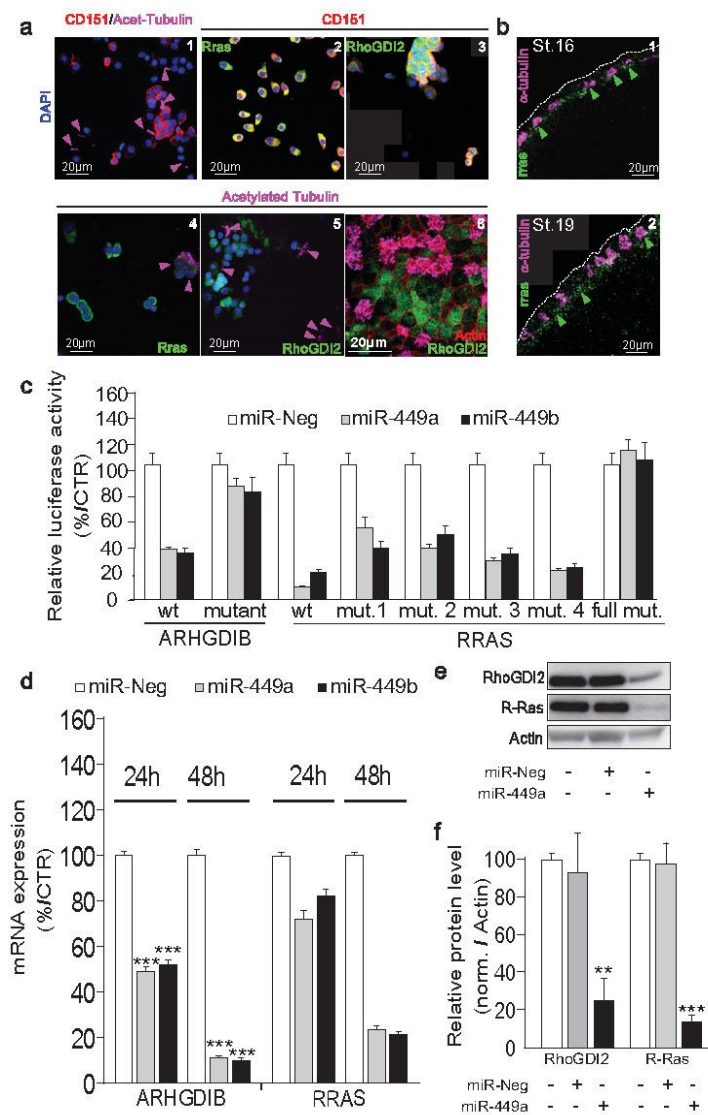


Figure 4

Expression of R-Ras and RhoGDI2 is controlled by MiR-449.

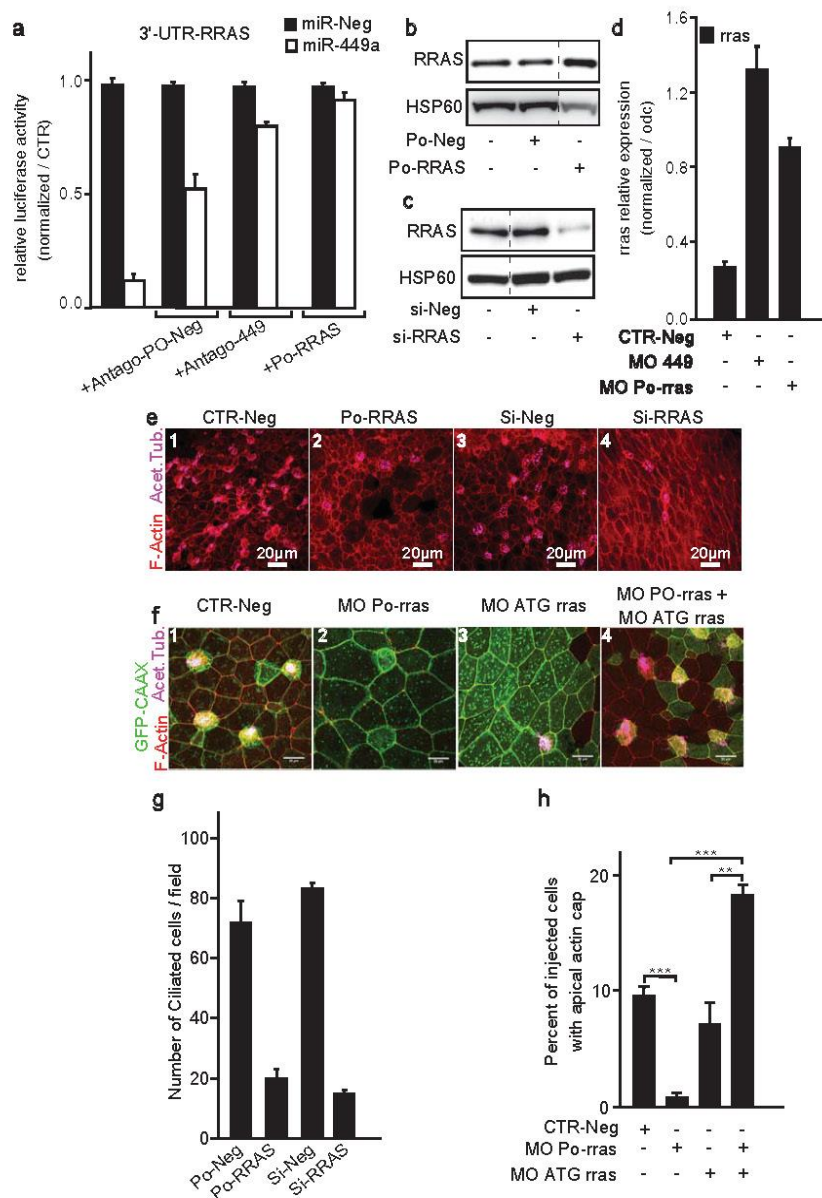


Figure 5

Inhibiting the interaction between *RRAS* mRNA and miR-449 affects multiciliogenesis and apical actin cytoskeleton reorganization.

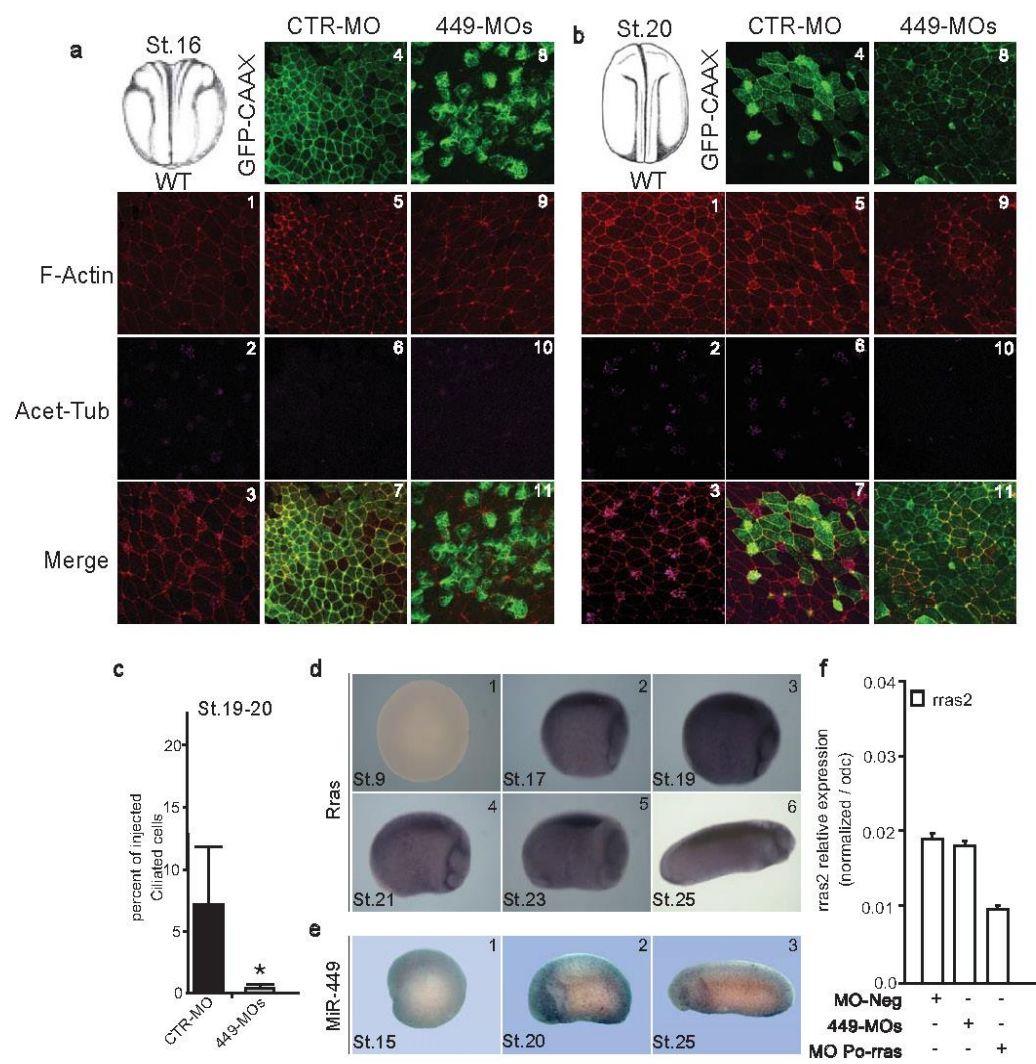


Figure S1

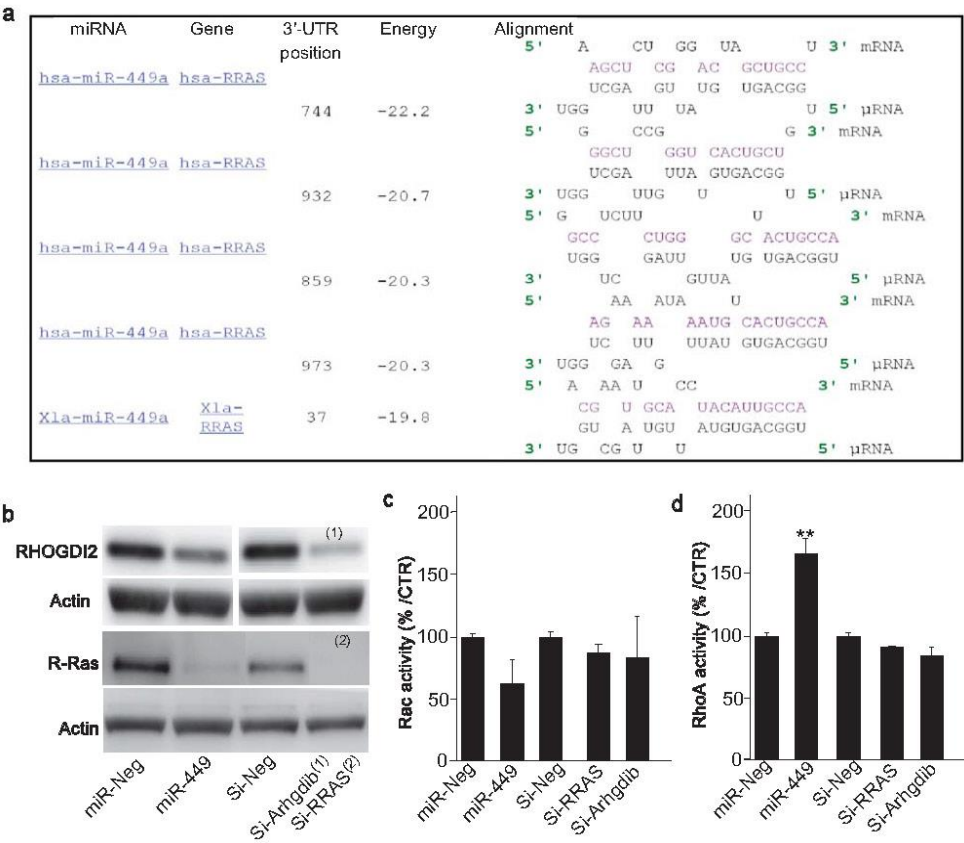


Figure S2

III. Rôle de la voie de signalisation BMP dans la différenciation des épithéliums multiciliés chez les vertébrés

Article 5 en cours de rédaction : Cibois, M.*, Luxardi, G.*, Chevalier, B.*, Thomé, V., Barbry, P., Marcet, B.\$ and Kodjabachian, L.\$. BMP signalling plays a prominent role in vertebrate mucociliary epithelium differentiation during development and regeneration

Contexte de l'étude

Chez le Xénope il est connu que la voie BMP joue un rôle lors du partitionnement de l'endoderme, et chez l'homme un lien existe entre la voie BMP et la transition épithélio-mésenchymateuse (cf partie III. 2. B). En revanche, aucune n'étude avant nous ne s'était intéressée à l'implication de la voie de signalisation BMP dans la différenciation des épithéliums multiciliés.

Résultats obtenus

Etude de la voie BMP dans la spécification des cellules de la couche interne et externe

Chez le Xénope, l'activation de la voie BMP par l'injection de BMP4, bloque la spécification de l'ensemble des types cellulaires. Ainsi, il est observé un blocage de la spécification des cellules de la couche interne *i.e* progéniteurs des cellules ciliées (CCP) et ionocytes mais aussi de cellules basales. En revanche, les cellules sécrétrices de mucus de la couche externe ne sont pas affectées, indiquant que la voie BMP est impliquée dans la spécification des différentes couches de l'épiderme de Xénope. L'inactivation de la voie BMP à l'aide de morpholinos dirigés contre BMP2/4/7, induit une forte augmentation du nombre de CCP et d'ionocytes dans la couche interne ainsi qu'un défaut de spécification des cellules sécrétrices de mucus dans la couche externe. Ces résultats en miroir soulignent un double rôle de la voie BMP : d'une part elle agit sur la spécification des couches interne/externe et d'autre part elle contrôle la balance entre ces deux couches. D'autres expériences ont confirmé ces résultats avec l'utilisation non pas de facteurs solubles, mais des formes de récepteurs constitutivement actifs ou inactifs des BMP. De manière assez similaire, l'injection de récepteurs constitutivement inactifs (DN-Alk3) induit une forte spécification des cellules multiciliées et des ionocytes et au contraire la forme constitutivement active (CA-Alk3) abolit la spécification des cellules multiciliées.

Chez l'homme, l'épithélium respiratoire pseudo-stratifié ne comprend pas d'ionocytes et il n'y a pas de phénomène d'intercalation de cellules d'une couche interne vers une couche externe. Ainsi, l'étude chez l'homme nous permet de nous focaliser sur le rôle de la voie BMP dans la différenciation des différents types cellulaires de l'épithélium respiratoire. L'inactivation de la voie BMP2/4, avec l'utilisation de l'inhibiteur endogène Noggin, induit de façon massive la différenciation des cellules multiciliées et dans une moindre mesure celle des cellules sécrétrices de mucus alors qu'au contraire la stimulation de la voie BMP avec l'utilisation de BMP2 l'abolit complètement. Morphologiquement, l'activation de la voie BMP bloque la polarisation de l'épithélium et provoque une formation d'un épithélium de type mésenchymateux. Ces observations suggèrent un contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) par la voie BMP comme montré précédemment (cf. partie III.2.B.2)).

Rôle de la voie BMP dans l'intercalation des CCP et ionocytes.

Les morphants BMP2/4/7 montrent une augmentation du nombre de CCP et d'ionocytes, qui ne s'intercalent néanmoins pas correctement dans la couche externe. Il a été montré qu'une augmentation du nombre de cellules qui s'intercalent dans la couche externe engendre des contraintes physiques empêchant ainsi une partie des cellules de s'intercaler. Ici, les CCP se différencient en cellules multiciliées mais aucune ne s'intercale dans la couche externe. Les mêmes observations de défaut d'intercalation ont été effectuées pour les ionocytes, indiquant ainsi un défaut d'intercalation lors de l'inhibition de la voie BMP dans les morphants BMP. L'inactivation d'acteurs de la voie BMP (forme inactive du récepteur Alk3 ou forme non phosphorylable de SMAD5), bloque l'activation de la voie BMP au sein même de la cellule réceptrice alors que l'invalidation des ligands BMP2/4/7 empêche la cellule réceptrice d'être stimulée par les ligands BMP extracellulaires. L'injection d'ARNm codant pour une forme inactive dominante du récepteur BMP2/4/7 (DN-Alk3) augmente significativement le nombre de cellules multiciliées et d'ionocytes qui s'intercalent correctement. Au contraire, l'utilisation d'une forme constitutivement active de ce récepteur (CA-Alk3) inhibe la différenciation des cellules multiciliées, comme cela est observé en réponse à une stimulation de la voie BMP par du BMP4. En outre, l'utilisation de l'effecteur transcriptionnel SMAD5 non activable (non phosphorylable – DN-SMAD5) de la voie BMP2/4/7 induit le même phénotype indiquant que cet effet est régulé au niveau transcriptionnel. Par la suite, nous nous sommes intéressés à déterminer l'état d'activation de la voie BMP *via* la phosphorylation du complexe SMAD1/5/8 dans les différents types cellulaires de manière à suivre cette activation transcriptionnelle.

Activation de P-SMAD1/5/8 et cross-talk avec la voie BMP.

Chez le Xénope, avant la spécification des cellules de la couche interne et externe, l'ensemble des cellules présente au niveau nucléaire des marques d'activation de la voie BMP avec le complexe SMAD1/5/8 phosphorylé. Plus tard, lors de l'intercalation, il n'a pas été possible techniquement de mesurer l'état de phosphorylation de SMAD1/5/8 en immunofluorescence dans les CCP et les ionocytes. En revanche, nous avons pu observer que les cellules sécrétrices de mucus et les cellules de la couche interne étaient positives pour la forme phosphorylée P-SMAD1/5/8.

Chez l'homme nous avons confirmé que BMP2 active bien la phosphorylation de SMAD1/5/8 et que cette phosphorylation est abolie en présence de l'inhibiteur endogène Noggin. Parallèlement à ces résultats, nous avons remarqué une forte diminution de la phosphorylation du complexe SMAD1/5/8 au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain. Ces résultats suggèrent fortement que le blocage de la voie BMP est requise pour la différenciation des cellules multiciliées, et que ce mécanisme est conservé du Xénope à l'homme.

Régulation de DLL1 par la voie BMP.

La voie BMP bloque l'intercalation des CCP et des ionocytes, cependant les marquages P-SMAD5 ne permettent pas de dire avec certitudes dans quelles cellules la voie BMP est activée. Nous avons alors déterminé l'impact de l'activation et de l'inhibition de la voie BMP avec des marqueurs précoces des CCP et des ionocytes. La voie Notch est connue pour contrôler la différenciation des cellules multiciliées et DLL1, son ligand, est fortement exprimé dans les CCP. Ici, nous avons confirmé ces observations avec une forte expression de DLL1 entre le stade 10 et 12 dans les CCP mais nous avons aussi détecté une forte expression de DLL1 dans les ionocytes entre les stades 12 et 14.

Lors de l'inactivation de la voie BMP par injection de DN-SMAD5 ou des morpholinos BMP2/4/7, on observe une diminution de l'expression de DLL1. Au contraire, l'activation de la voie BMP induit une augmentation de l'expression de DLL1, indiquant que la voie BMP participe au contrôle de l'expression de DLL1 dans les CCP et les ionocytes. De manière intéressante, des analyses plus poussées indiquent des résultats opposés sur l'expression de DLL1 en fonction du stade où BMP4 est injectée. En effet, avant le stade 10, BMP4 induit une forte expression de DLL1 mais de manière inattendue abolit l'apparition des CCP caractérisée par de fort niveau de DLL1. A partir du stade 10.5, l'injection de BMP4 n'a plus d'effet sur l'expression de DLL1 et on détecte des CCP. Ces résultats indiquent qu'une fois la spécification enclenchée avec l'augmentation de DLL1 au stade 10, les CCP ne sont plus capables de réagir à la stimulation par BMP4 et de bloquer la spécification en CCP.

Conclusion

Nous avons montré que la voie BMP régule la différenciation de l'épiderme embryonnaire de Xénope ainsi que la différenciation de l'épithélium respiratoire humain. L'inhibition de la voie BMP conduit à une différenciation accrue vers un phénotype multicilié alors qu'au contraire son activation bloque la différenciation de l'épiderme embryonnaire de le Xénope et dans l'épithélium respiratoire humain induit la transformation des cellules épithéliales en type mésenchymateux. L'interconnexion avec la voie Notch, contrôlant aussi la différenciation vers un phénotype multicilié, reste encore à être déterminer plus clairement. Cependant, nos résultats suggèrent que le contrôle de la voie Notch est dépendant de l'état d'activation de la voie BMP.

Il a été décrit que la voie BMP induit Vent-2, un facteur qui maintient les cellules dans un état pluripotent. Cette observation pourrait expliquer la perte de spécification des cellules de la couche interne de l'épiderme chez le Xénope lors de l'activation de la voie BMP. Au moment de la spécification des cellules de la couche interne de l'épiderme d'embryon de Xénope, la voie Notch intervient pour la spécification des CPP et des ionocytes. Certains travaux indiquent que la voie Notch et la voie BMP interagissent entre elles, notamment il est montré que la voie BMP potentialise la voie Notch. Les résultats obtenus ici avec des blocages et des activations fortes de la voie BMP n'est pas révélateur de la contribution de chacune de ces voies *in vivo*. Le contrôle de l'expression de DLL1 par la voie BMP révèle potentiellement un rôle de la voie BMP dans le contrôle de la force de l'inhibition latérale pour la mise en place d'un patron propre à l'épiderme de Xénope à travers le contrôle de l'expression de DLL1. Cependant, il nous reste à déterminer clairement le rôle de Vent2 dans le maintien des cellules pluripotentes empêchant la spécification des MCC. Aussi, chez l'homme la caractérisation de l'activation de la voie BMP dans les différents types cellulaires est nécessaire pour mieux caractériser le rôle potentiel de la voie BMP dans les différents types cellulaires. Aussi, de manière similaire au Xénope, la stimulation de la voie BMP après la différenciation de l'épithélium respiratoire, et l'étude de la sensibilité de certains types cellulaires à la voie BMP peut apporter aussi de nouveaux éléments de réponse.

BMP signalling plays a prominent role in vertebrate mucociliary epithelium differentiation during development and regeneration

Cibois, M.^{1*}, Luxardi, G.^{1*}, Chevalier, B.^{2*}, Thomé, V.¹, Barbry, P.², Marcet, B.^{2\$} and Kodjabachian, L.^{1\$#}

1. Aix-Marseille University, CNRS, UMR7288, Institut de Biologie du Développement, Marseille, France

2. Nice Sophia-Antipolis University, CNRS, UMR 6097, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France

* these authors contributed equally

\$ co-senior authors

corresponding author

Summary

In vertebrates, mucociliary epithelia play prominent physiological roles such as mucus clearance in the airways or cerebro-spinal fluid circulation in brain hemispheres. Our understanding of the mechanisms that control cellular identities within such epithelia is very limited. To gain insight into this question, we used a developmental model, the *Xenopus* embryonic ciliated epidermis, as well as a regeneration model, primary human airway epithelial cell (HAEC) cultures. In HAECs, BMP inhibitors dramatically increased the rate of multiciliated cell (MCC) and mucus-secreting cell (goblet) formation, whereas recombinant BMP4 protein globally suppressed differentiation within the epithelium. In *Xenopus*, depletion of BMP2/4/7 ligands increased the number of MCCs and ionocytes, whereas it decreased goblet cell markers. Conversely, exposure to exogenous BMP4 protein suppressed MCCs, ionocytes and basal cells. Our data suggest that some of those effects may be explained by the regulation of the Delta/Notch pathway by BMP signalling. Altogether, our results identify the repression of BMP signalling as a necessary and sufficient condition for mucociliary epithelium differentiation during development and repair.

Introduction

In the past few years, *Xenopus* epidermis became a model of choice for the study of mucociliary epithelium development. *Xenopus* embryo skin's structure closely resembles to other mucociliary epithelium like the one covering upper airways in human. Basic molecular techniques can be used and as it is an external tissue, it is easy to handle and to image (reviewed in (Werner and Mitchell, 2013)).

Xenopus embryo epidermis derives from the non-neural ectoderm, which is specified in two steps. First, the ectoderm is set apart from the mesoderm and endoderm. Second, it is partitioned into neural and non-neural regions.

It is well known that the BMP pathway is involved in the dorso-ventral patterning of *Xenopus* embryos and more specifically of the gastrula ectoderm. BMP ligands are extracellular proteins. They process by binding to heterotypic complexes of BMP receptors type I and II. The type I receptors are also known as activin-like kinase receptors and act downstream of the type II ones. During canonical BMP pathway activation, BMP receptors phosphorylate two serines in the C-terminal part of the Smads 1, 5 and 8 transcription factors family, called R-Smads for Receptor-regulated Smads. This leads to their activation and shuttling to the nucleus. They form a complex with Smad4, a co-activator, and activate the transcription of BMP target genes (Derynck et al., 1998; Plouhinec et al., 2011). During some developmental processes and carcinogenesis, BMP pathway can also act non-canonically via p38, RhoGTPases and MAP kinases (Chen et al., 2012).

On the ventral side of embryos, a group of cells designed as the ventral centre, expresses BMP proteins, notably BMP 2, 4 and 7. In this region, other positive regulators of the BMP pathway such as BMP1/Tolloid take part to the establishment of a BMP source (De Robertis et al., 2001). On the dorsal side, by opposition, Spemann's organizer produces antagonists of the BMP pathway. As an example Chordin and Noggin physically interact with BMP and inhibit its binding to receptors. The ventral agonists and the dorsal antagonists interact into a self-regulating network active across the entire embryonic field (De Robertis, 2006) and create a BMP activity gradient which in turn leads to the partitioning of the ectoderm into neural and non-neural territories (De Robertis and Kuroda, 2004). *In vivo* assays have shown that BMP pathway is not only the main actor of this partitioning but that its activation is sufficient to transform neural into epidermal progenitors, whereas BMP inhibition is sufficient to transform epidermal into neural progenitors (Chang and Harland, 2007; Delaune et al., 2005; Marchal et al., 2009). Following its specification by BMP signalling, the non-neural ectoderm will give rise to the mature embryonic ciliated epidermis in a four steps process. (i). During segmentation and blastula stages, asymmetric divisions lead to the formation of two distinct layers of cells in

the ectoderm. (ii). The precursors of the ciliated cells and of the ionocytes, as well as the « basal » cells are specified during gastrulation, in the inner layer of the non-neural ectoderm, whereas precursors of the mucus-secreting cells are specified in the outer layer. (iii). During neurulation, ionocytes and ciliated cells intercalate into the outer layer. Ciliated cells also produce hundreds of centrioles (iv). Once in their final position, cells of the outer layer fully differentiate, whereas internal cells remain in a progenitor state.

To date, the main pathway that has been involved in cell fate choices in the xenopus epidermis is the Notch pathway and the lateral inhibition process (Deblandre et al., 1999). An activation of the Notch pathway leads to a strong decrease in the number of ciliated cells (Stubbs et al., 2006; Stubbs et al., 2012) and ionocytes (Dubaisi and Papalopulu, 2011; Quigley et al., 2011). On the contrary, a repression of Notch induces these cell fates (Marcet et al., 2011; Stubbs et al., 2006). Delta1 ligand is expressed in the tissue and is the best candidate for the Notch ligand responsible for the lateral inhibition. Controlling tightly the activation of the Notch pathway is then a prerequisite for the building of a sane epithelium. A recent study highlighted the role of microRNAs from miR449 family, targeting the expression of Delta1 and Notch1 in ciliated cells precursors, and required for the ciliogenesis (Marcet et al., 2011).

To try to better understand how the mucociliary epithelium develops, we asked if, besides its role in ectoderm partitioning, BMP pathway could also be involved in cell fate decisions and ciliated cells formation. Only few papers reported a link between BMP and the cilia. Notably, Komatsu and collaborators have shown that BMP pathway is involved in the motile ciliogenesis in the node (Komatsu et al., 2011). Nevertheless, this effect was linked to the cell cycle arrest and not to the fate or ciliogenesis per se. Moreover, it has never been studied in the field of multiciliogenesis.

In this paper, we took advantage of the xenopus model to study the role of BMP pathway during the mucociliary epithelium development. We used HAEC primary cultures as a regeneration model. Gain and loss of function experiments in xenopus revealed two successive roles of BMP pathway during the formation of epidermis. Comparison with human HAEC primary cultures highlighted its importance in regenerative tissue and the conservation between the two species.

Results

BMP over-expression represses internal layer cell fates

In a first attempt to decipher the role of the BMP pathway in the cell fate determination, we injected the zebrafish recombinant BMP4 protein in the blastocoel of stage 9 embryos. Embryos were developed until stage 25. We used a range of amount of protein that ensures neural part of the embryo to still specify and embryos develop properly as shown on figure 1A. However, they strikingly show a strong decrease in the number of ciliated cells stained here by ISH with an α -Tubulin probe (Figure 1A).

To go further into the analysis, staining for the different cell types of the epidermis have been realised on transverse sections. None of the internal layer fate emerges after BMP4 over-expression. Indeed acetylated α -tubulin, Foxi1e (figure 1B) and P63 (Figure 1C), markers respectively of ciliated cells, ionocytes and internal cells, were not expressed in these stage 25 embryos. These markers are never expressed in the epidermis of the BMP4 injected embryos, even at the really beginning of their expression (dns). By contrast, the external layer is properly specified. Indeed, Intelectin expression in goblet cells is conserved (figure 1C), even induced.

We used SEM to analyse the effect of BMP4 injection on the external morphology of the tissue. We confirmed that goblet cells are the only cell type at the surface of the embryos even at stage 37. The goblet cells still show vesicles at their surface after BMP4 over-expression, like in control embryos, suggesting that they have differentiated properly and have an active secretory system (figure 1D).

The injection of BMP4 also leads to thickening of the epidermis, as revealed by the DAPI staining. BMP4 over-expression is therefore deleterious for the inner layer cell fates but allows the correct development of the outer one. These first results therefore indicate a role of BMP pathway on the layer determination.

BMP inhibition promotes only the intercalating cells.

To better characterise BMP pathway role in the epidermis development, we injected a mix of morpholinos targeting BMP ligands 2, 4 and 7 to inhibit the BMP activity specifically in the presumptive epidermis. The phenotype observed was not the exact mirror of the over-expression of BMP4. We used FISH against α -tubulin and Foxi1e to count the number ciliated cells and ionocytes precursors (Figure 2A). The BMP morphants embryos' epidermis contains 2 to 3 times more of these two cell types than the control embryos as depicted on the graph figure 2A'. The expression of 5G7 and Intelectin in the outer layer was inhibited (figure 2B).

Quantification of the fluorescent signal from 5G7 showed a significant decrease in its level of expression (figure 2B'). For the intercalating and goblet cells, these data correlate with the over-expression experiment. However, the inner cells were sensitive to both BMP inhibition and activation. In BMP morphants, inner cells are present, as shown by P63 expression but they express lower levels of alpha dystroglycan (aDG) (Figure 2C). This phenotype is weaker than with BMP activation, as none of the inner cell marker is detectable anymore (Figure 1C) but the effect is similar. With this loss of function experiment, we highlighted a role of BMP not only in the determination of an inner versus an outer layer but on the balance between the inner layer cell fates. BMP ligands are diffusing factors. We next used constitutively active (CA-Alk3) or dominant negative (DN-Alk3) forms of the BMP receptor to study the cell autonomous effect of the modulation of the pathway (Figure S1). As previously shown with the BMP4 protein, ciliated (stained with Acetylated α -tubulin) and ionocyte (stained with V1a) fates were strongly inhibited by the injection of CA-Alk3. Dn-Alk3 confirmed the results obtained with morpholinos, and induced 2 times these two cell fates. The effect of BMP on the cell fate determination is therefore a cell-autonomous effect.

We next used the Smad5-somitabun, a form of Smad5, which is not phosphorylable to disrupt the transcriptional complex induced by BMP activation (called dnSmad5 thereafter). The injection of this construct also leads to a strong increase in the number of ciliated cells (figure S2). This indicates that the effect of the inhibition of the BMP pathway on the ciliated fate is linked to its transcriptional activity.

Once the effect on the cell specification characterized, we next wanted to study the impact of the BMP inhibition on the ciliogenesis itself. We first used acetylated α -Tubulin staining in BMP morphants compared to control and detected a decrease in the number of differentiated ciliated cells (figure 3A). Section analysis next indicated that the cells are able to build cilia because they suffer from intercalation defects (figure 3B). It has already been shown that intercalation of the ciliated cells is submitted to spatial constraints (Stubbs et al., 2006). When too much cells are specified; only twice the wild-type number can intercalate. The other cells are blocked into the epidermis and intercalate during the elongation of the embryo (Stubbs et al., 2006). Anyhow, in the case of BMP inhibition, none of the specified ciliated cell managed to intercalate, neither at 25, neither later in the development. Moreover, ionocytes are not constrained as the CC (Stubbs et al., 2006) but, in BMP morphants, they do not intercalate. This phenotype suggests that spatial restrictions are not causal here and that the BMP pathway might have a central role in the intercalation process. These defects were not observed after this injection of DN-Alk3 (acetylated alpha-tubulin staining from figure S1) nor dnSmad5 (DNS). Intercalation defects are therefore specific to the BMP morphants and were not studied in details here.

This second phenotype shows that (i) BMP acts on intercalation independently of the cell fate choices, (ii) probably using non-canonical path and (iii) it also suggests that BMP is not required for ciliogenesis, as DN-Alk3 and dnSmad5 injected embryos build cilia. This last suggestion is in agreement with experiments led on the primary cultures of human airways. As shown on figure H1, Noggin induces more ciliated cells. These cells are positive for centrin-2, a centriole marker and Tubb-IV, a cilia marker, meaning that the cells are fully differentiated. At the opposite, BMP-2 stimulation of HAECs strongly decrease the number of ciliated cells and mucus secreting cells (figure H2).

In sum, BMP pathway inhibition leads to defects in the balance of the different cell types of the epidermis. All the methods we used to inhibit the pathway provoke the same induction of the intercalating cells. We reasoned that BMP pathway should then be repressed in these cells to allow their emergence. We analysed the phosphorylation of Smad1/5/8 (P-Smad1/5/8) proteins as a marker of BMP activity.

BMP pathway is activated ubiquitously

Description of the P-Smad1/5/8 expression pattern has already been done in *Xenopus* at the embryo level (Fagotto et al., 1997). Here, we wanted to analyse the epidermis pattern of activation at cellular levels. We made a time course analysis of P-Smad1/5/8 expression. Most of the cells display positive nuclear staining for P-Smad1/5/8 during the stages of development we analysed. Three of these stages are represented in figure S3. Due to the specific conditions of sample preparation to use the antibody against the P-Smad1/5/8 proteins, we were not able to combine this staining with FISH and thus, to detect the earliest expression of the markers. Nonetheless, co immuno staining at stage 14 with the 5G7 (goblet cells marker, figure 4A) and P63 (internal cells marker, figure 4B) antibodies showed that these two cell types are P-Smad1/5/8 positive. It also pointed out that the other internal cells, negative for P63 and therefore intercalating cells, could also be positive for P-Smad1/5/8 (figure 4C). With this experiment, we cannot rule out totally that there is no difference in expression levels depending on the cell type, but potentially all the cells of the epidermis experience BMP activation during the development of the tissue. P-Smad1/5/8 expression pattern was then not sufficient to understand the cell fate choices linked to BMP pathway.

In HAECs, a strong increase of the phosphorylation of Smad1/5/8 is observed at the beginning of the airway differentiation. At tpolarization time, P-Smad1/5/8 decrease at the same time than notch activation as showed (figure H3). Here detection using immune-staining is necessary to determine a cellular specific localisation in HAECs.

Delta1 is expressed in the intercalating cells precursors.

The loss-of-function experiment (Figure 2) indicates that only intercalating cells are inhibited by BMP pathway. We therefore led a study on the earliest markers of cell fates to identify common markers for ionocytes and ciliated cells precursors. We used FoxJ1 as an early marker of CCP (Stubbs et al., 2008) and Foxi1e for the ionocytes (Dubaisi and Papalopulu, 2011). First, we showed that, as already suggested (Deblandre et al., 1999), Delta1 is expressed in the precursors of ciliated cells. Indeed, FoxJ1 is expressed in Delta1 expressing cells from stage 10 to stage 12 (Figure 5A, B and C). Moreover, we also detected later Delta1 expression in Foxi1e positive cells. Foxi1e and Delta1 are co-expressed from stage 12 to stage 14. After stage 14, Delta1 is not detectable in the epidermis anymore.

This result put Delta1 positive cells as precursors for both CC and ionocytes. It reinforces previous data from Kintner's lab showing that CC and ionocytes are not reciprocal populations (Stubbs et al., 2006). It is also in accordance with all the Notch modulation experiments in which same effects are observed on ccp and ionocytes. We demonstrated here that there is a two-waves like mechanism leading to the specification of first CCP and second ionocytes. Whether they emerge from a common precursor or whether Delta1 is re-expressed a second time remains to elucidate.

Delta1 expression is modulated by the BMP pathway.

Knowing that (i) Delta1 is expressed in both ionocytes and ciliated cells and (ii) BMP pathway has a negative impact on their formation, we analysed the expression of Delta1 after BMP gain or loss of function. Unexpectedly, BMP4 injected at stage 9 strongly up-regulates the expression of Delta1 at stage 10, first stage at which Delta1 expression is detectable by FISH (figure 6A). This over-expression is maintained at least until stage 25 (figure 6B). This is correlated to a disappearance of all the other markers of internal layer we have tested as we first showed in figure 1. In xenopus embryo epidermis, Delta1 is able to inhibit Notch in the same cell (cis-inhibition) besides the classical trans-activation. When Delta1 is over-expressed in the tissue, it normally leads to more ciliated cells specification; it was then surprising to associate a Delta1 over-expression with the absence of ciliated cells.

We also analysed the effect of BMP4 protein injection in time. The BMP4 protein was injected at stage 8, 9, 10, 10.5 and 11 and expression of Delta1 was analysed both 2 hours after the injection and at stage 12, stage at which Delta1 expression peaks. This experiment indicated that the induction of Delta1 is only transient. From stage 10.5, BMP4 is not able anymore to induce Delta1 (figure S4). Embryos at stage 25 were stained for a-tubulin showing that the transient effect on Delta1 expression is correlated to a transient inhibition of the CCP fate. Indeed, the embryos injected at and after stage 10.5 produce ciliated cells precursors. This

result evidenced that (i) cells of the non-neural ectoderm become insensitive to BMP signalling at stage 10.5 (ii) the induction of Delta1 by BMP4 is probably indirect.

This transient effect of BMP4 could be actually linked to the commitment of the cells. Indeed, BMP pathway is known to induce X-Vent genes. Particularly X-Vent2 is a direct target of BMP (Rankin et al., 2011). Yet, Vent2 has been recently shown to be a Nanog homologous in xenopus and to maintain pluripotency (Schuff et al., 2012). To test whether the phenotypes observed could be explained by an effect on pluripotency we analysed Vent2 expression in the same time course assay described before.

These results correlate with the results obtained in the regeneration model. Indeed, HAECs in culture treated with Noggin showed increase number of both B4 tubulin and Muc5A positive cells (figure H2 A and B). The opposite phenotype is obtained with BMP2 treatments. A regenerative epithelium has to produce all the cell types constituting the tissue. BMP has to be repressed for the production of these cells from undifferentiated tissue.

We next examined the expression of Delta1 after BMP inhibition and we observed a decrease. We used dnSmad5 construct, known to be a strong inhibitor of the pathway. In dnSmad5-injected embryos, Delta1 was significantly repressed in the injected cells compare to non-injected ones at this stage (figure7). The same results were obtained using BMP morphants (data not shown). BMP is therefore able to induce Delta1 but also required for a normal level of expression. We next evaluate the impact of the changes in Delta1 expression levels on the Notch pathway activity. We used an antibody directed against the C-terminal part of the Notch1 receptor. This stains both the full-length receptor and the cleaved NICD. Confocal images of these immuno-staining on sections were next filtered using ImageJ and only the nuclear signal is shown on figure S5. In all the conditions, wild type, BMP4-injected, Control, and BMP morphants, the nuclear Notch signal was comparable. Nonetheless, Notch signalling is highly dynamic and NICD hardly detectable. Regarding the quality of the non-filtered signal (Figure S5B), this does not exclude subtle changes on Notch activity.

Discussion

In this study, using both gain and loss of function experiments, we evidenced that the BMP pathway activity, even if necessary for non neural ectoderm specification, has to be tightly controlled, in a developing as well as in a regenerating mucociliary epithelium for the emergence of the different cell fates.

The functional analysis carried out in xenopus embryos showed that BMP signalling pathway is first involved in the transition from pluripotent to committed cells. These data were confirmed in HAECs primary cultures. In a second time, BMP is involved in the balance of cell fates within the developing tissue.

BMP4 and pluripotency

BMP has to be repressed to allow the commitment of the cells to their fates in the inner layer. This data is reinforced by experienced in human airways primary culture showing that the regeneration of the tissue goes through an inhibition of the pathway. This is necessary to produce both ciliated cells and goblet cells at the surface of the epithelium.

BMP4 also induced Delta1 expression, putting delta1 in a broad progenitor marker status. Usually, Delta1 is linked to cell fate decisions, but, as explained in the previous paragraph, it is here associated with a pluripotent state of the inner layer epidermal cells. Even if unexpected, this result could be in accordance with the mathematical models existing (Lewis, 2003) on lateral inhibition. This broad and strong expression of Delta1 in the inner layer of the epidermis revealed by BMP4 over-expression probably looks like the first, undetectable expression of delta1 in wild type embryos, at much higher levels. The expression of this Notch ligand would next be refined to specific cells, that we showed being ciliated cells precursors and ionocytes, when lateral inhibition occurs.

The effect of BMP4 on Delta1 and vent2 expression takes place only in the internal layer. At stage 9, the antagonism between aPKC and PAR1 has already defined an external aPKC positive layer and an internal PAR1 positive layer. aPKC has been demonstrated to be a repressor of Delta1 (Ossipova et al., 2007). Possibly, the expression of aPKC in the outer layer is sufficient to inhibit the induction of Delta1 by BMP4 protein in the outer layer. But, this can only explain the absence of Delta1. In addition to the absence of induction of Delta1, the outer layer cells express Intelectin. The expression of this goblet cells marker is, in wild type embryos, first seen at stage 13, meaning later after the injection of BMP4 in this test. The outer layer is therefore able to overcome the BMP activation and to carry on its development. We can expect the polarity of the tissue has also an impact on the ability of the cells to respond to BMP signals.

Delta1 regulation

The link between Delta1 expression and BMP cannot be reduced only to a progenitor state of the cells. In the case of BMP morphants, or after the injection of dmSmad5, Delta1 is repressed in the injected cells. However, its expression is never abolished. Either, as only KD methods have been used, remaining BMP signalling is able to induce slightly Delta1 or BMP is not absolutely required for the expression of Delta1. Genetic approaches will be necessary to decipher precisely the requirement of BMP for Delta1 expression.

With the KD methods we used, after a decrease in the expression of delta1 at the beginning of its expression, more delta1 positive cells are present in the later stage 12 (figure 8). As the ciliated cells and ionocytes specification is linked to delta1 and the Notch lateral inhibition, we can postulated that starting with a lower level of Delta1, epidermis will eventually lead to higher production delta1 positive stable cells due to reduced lateral inhibition. Unfortunately, the quality of the staining obtained with the Notch1 antibody did not allow us to estimate precisely the activity of Notch in our tests. BMP is necessary to control Delta1 expression. However, the transient and spatially restricted (to the internal layer) aspect of the induction of Delta1 suggested an indirect regulation.

Interaction between BMP and Notch signalling

We showed that the inhibition of BMP and of Notch signalling pathways has the same effect on the generation of CCP and ionocytes. It increases up to 3 times for BMP and even more for Notch the number of CCP (figure 2A). Both of these pathways are also required for proper levels of expression of aDG (Figure 2C, (Sirour et al., 2011)). In the literature, these two pathways have already been shown to interact. The most described interactions showed that the BMP pathway reinforces the action of Notch on its target genes (Itoh et al., 2004; Takizawa et al., 2003). In the epidermis, it could help Notch to activate target genes and to exert proper lateral inhibition to reduce the number of CCPs and ionocytes.

However, if Notch signalling can repress Delta1 (Deblandre et al., 1999), we observed that BMP, on the contrary induces its expression. Therefore, BMP and Notch pathways could co-ordinately ensure proper lateral inhibition process but acting in parallel.

How BMP is regulated in the tissue to have different levels?

This study strikingly demonstrates that the main actor of the epidermis specification in xenopus embryo has a negative impact on the emergence of two cell-types composing the tissue. It

raises the question of the regulation of the BMP pathway in the tissue. How the BMP levels are regulated to allow the formation of CCPs and ionocytes in a BMP positive tissue?

The classical antagonists of BMP (Noggin, Bambi, Smad6/7, Chordin...for review see (Rider and Mulloy, 2010) have been largely involved in the patterning of the ectoderm (De Robertis and Kuroda, 2004; Delaune et al., 2005; Marchal et al., 2009). Their known expression pattern, even if not a definitive proof, is not compatible with a predominant role in the epidermis cell fate choices. We therefore focused more on Syndecan-1. Syndecan-1 is a modulator of BMP pathway expressed in the internal layer (Teel and Yost, 1996). It can be a positive or a negative regulator of BMP, depending on its level of expression, during dorso ventral patterning (Olivares et al., 2009). The expression in the inner layer is ubiquitous (Teel and Yost, 1996). Repressing its expression specifically in the epidermis using morpholinos mimics the inhibition of BMP pathway (DNS). In the epidermis, it seems that Syndecan1 acts as an activator of BMP pathway and is therefore not a good candidate for the spatial regulation of BMP in this tissue.

Over-expression of the mutant dnSmad5 also leads to an increase in the number of ciliated cells suggesting that the effect of BMP on cell fate balance is transcriptional. BMP pathway is also regulated at the nuclear level. This would be more in agreement with the P-Smad1/5/8 activity pattern as we did not observed significant differences in the levels of P-Smad1/5/8 in the nuclei of the distinct cells. Several nuclear factors have been described to inhibit or enhance the Smad transcriptional activity. These factors can associate with Smads complexes, BMP or TGFbeta responsive. Tob proteins are able to bind, directly to Smad 1/5/8 and to change there localisation to nuclear bodies (Yoshida et al., 2000), inhibiting there transcriptional activity. They also inhibit BMP signalling binding directly to Smad6 and reinforcing its effect (Yoshida et al., 2003). However, Tob2 expression pattern has been analysed in xenopus and is broadly expressed in the epidermis at the time of CCP specification (Yoshida et al., 2003). YY1 protein increases (Lee et al., 2004) or decreases (Kurisaki et al., 2003) BMP transcriptional activity. Transcriptional co-activators are also more well characterised for the BMP pathway, including p300/CBP, GCN5_PCAF and runx factors. These factors could on the contrary reinforced BMP in outer layer and basal cells to create a disequilibrium that could be enough to allow all the fates to emerge. Unfortunately, even if they have been identified in the xenopus genome, these factors are really poorly described in this model.

Few studies have also shown regulation of the BMP pathway by microRNAs [34]. Here we showed that BMP activation induces DLL1 expression and that BMP inhibition decrease DLL1 expression. Interestingly, we previously indicated that miR-449 directly controls multiciliogenesis by directly targeting DLL1 in vertebrate's mucociliary epithelium. Here we can hypothesise that BMP pathway can regulate the expression of DLL1 through the action of miR-

449. But, miR-449 expression pattern (Marcet et al., 2011), suggest that, if existing in vivo, miR-449 could start to repress BMP in the ciliated cells from stage 15, much later after cell fate decisions. But it's possible that undetectable expression of miR-449 could actually be implicated in this context.

Intercalation defects

Besides cell fate choices defects, BMP morphants present a second, very robust phenotype in the absence of intercalation. This step is crucial in the development of the mucociliary epithelium in xenopus as it is required for the final differentiation of the CC and the building of the cilia.

Intercalation process in the mucociliary epithelium is still poorly described. What is known so far is that the intercalation processes in two steps. First, cells are wedging in between the two layers and second, they reach the outside. Stubbs and collaborators have shown that ciliated cells can only intercalate at vertices and consequently are surrounded by non-ciliated cells. Ionocytes, by opposition can intercalate anywhere, probably linked to their smaller size. They are often found next to ciliated cells. In the BMP morphants, neither ciliated cells (figure 3) nor ionocytes (date not shown) intercalate. The two cell types initiate the process and can be found just under the outer layer but they never fully intercalate. The fact that the two types of intercalating cells are blocked suggests a general role of BMP on this process.

We showed that alpha DG expression is reduced after BMP inhibition (figure 2C). Alpha DG is a transmembrane protein involved in the assembly and maintenance of basement membrane structures. It has been shown to be important for ciliated cells intercalation (Sirour et al., 2011). The intercalation defects we observed could then be due to the partial loss of aDG expression. But it is tempting to say that this only effect cannot be responsible of the strength of the phenotype we observe. Indeed, aDG morphants show reduced intercalation but some ciliated cells manage to intercalate, even if it is in a wrong pattern (Sirour et al., 2011). In BMP morphants, we could not see intercalated cell, suggesting that other BMP targets are involved in this phenotype.

In addition to a potential role of the canonical BMP pathway, these defects could also be due to the role of the BMP pathway on the cytoskeleton. Indeed, BMP is able to modulate the stability of the actin cytoskeleton as well as microtubules. It can activate de Rho/ROCK kinases, resulting in phosphorylation cascade between LINK1/2, cofilin. Cofilin prevent actin polymerisation and is inactive when phosphorylated. BMP therefore leads to actin polymerization, which is linked to cell migration (Gamell et al., 2011).

We can as well expect that somehow, cells are first polarized before they start to intercalate. In chick neural tube, once activated, BMP receptors phosphorylate Smads associated proteins,

but instead of shuttling to the nucleus, they complex with tight junctions and ensure their stability. This has an impact on polarity actors like LGL and aPKC apico basal polarity (Eom et al., 2011; Eom et al., 2012).

To conclude, we show here that BMP, which is totally required for the induction of epidermis, has next to be strictly controlled to build the tissue properly, both during development and regeneration. It first has to be repressed to escape from pluripotency state. Next, intercalating cells has to experience a decrease of BMP activity to get specified. However, has highlighted in BMP2/4/7 morphants, intercalation requires non-canonical BMP activity that has to be determined. This suggests that intercalating cells will eventually need BMP to intercalate and finish their differentiation.

Material and method

Xenopus injections

Eggs obtained from NASCO females were fertilized *in vitro*, dejellied, cultured and injected as previously described (ref 30 de NCB).

Capped *dnSmad5* cRNA was generated with the Ambion mMessage Machine kit. pCS105-GFP-CAAX (a gift from Chenbei Chang) was linearized with *Asel* and cRNA was synthesized with Sp6 polymerase.

Morpholino oligonucleotides (MO) against BMP ligands 2, 4 and 7 (GeneTools, LLC, Philomath, Oregon, USA) were antisense to *Xenopus laevis* BMP ligands sequences: MO-BMP2: 5'-GATCCCAGCGACCATTGTCAACCTG-3'; MO-BMP4: 5'-CAGCATTCGGTTACCAGGAATCATG-3'; MO-BMP7: 5'-TTACTGTCAAAGCATTTCATTTTGTC-3';

For the BMP overexpression, between 2 and 7 ng of zebrafish recombinant BMP4 protein were injected at stage 9 in the blastocoele of embryos. BSA was injected as a control. Embryos were cultured in MBS 0,1x until the appropriate stage.

All injections were done at least three times.

Immunohistochemistry:

Embryos were fixed in formaldehyde or paraformaldehyde 4%. *Xenopus* multiciliated cells were stained with anti-acetylated tubulin monoclonal antibody (clone 6-11B-1, 1:200, Sigma), goblet cells with a 5G7 antibody (gift from Saburo Nagata) internal cells with P63 antibody (1:100, abcam ab111449) P-Smad1/5/8 staining has been made with the cell signalling (9511, 1:100) Secondary antibodies were all from molecular probe and coupled to different alexas. To reveal the GFP-CAAX, we used a chick anti-GFP antibody (1:500; Molecular Probes) together with a secondary antibody coupled to Alexa 488 (Molecular Probes).

ISH and FISH:

Colorimetric ISH have been made as previously described (Gawantka) with the following modifications (i) post-fixation following proteinase K treatment was omitted; (ii) hybridization and washes were performed at 60 °C; and (iii) incubation with the anti-digoxigenin antibody was done in MAB (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5) and washes were done in MAB supplemented with 0.1% Triton X-100.

For FISH, Triethanolamine and acetic anhydride treatment were added. Anti-dig POD and anti fluo POD were incubated ON at 4°C. For the staining, we used the TSA+ kit from Perkin Elmer 1h at RT followed by an inactivation of the enzyme using H₂O₂ at 2% in PBS during 20min. Double staining were made sequentially.

FISH on sections:

Embryos were fixed in either Formaldehyde or paraformaldehyde 4% for adapted time, stored in methanol. They were rehydrated in PBT, treated with triethanolamine and acetic anhydride, prepared with crescent sucrose baths and finally embedded with OCT. 10µM sections were made. FISH was realised as an adaptation of classical FISH experiment. On whole mount embryos with adapted times to sections.

Fluorescence quantification:

Expression levels on FISH were analysed using ImageJ.

Ratios between the expression levels and the corresponding surface in injected and non injected areas were calculated. These ratios were compared in a paired way within each section, in control and BMP morphants or dnSmad5, using the Wilcoxon test of Prism Graph 6.

Ciliated cells counting:

Stacks of confocal images from 4 to 5 explants per experiments and per condition were made. Z projection of the green channel pictures was used to count positive cells for GFP, e.g. injected cells. Ciliated cells and ionocytes were counted using a merge of their corresponding channel with the green one to count only the injected ones. Statistical analysis was made using graph prism.

- Chang, C., and R.M. Harland. 2007. Neural induction requires continued suppression of both Smad1 and Smad2 signals during gastrulation. *Development*. 134:3861-3872.
- Chen, G., C. Deng, and Y.P. Li. 2012. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences*. 8:272-288.
- De Robertis, E.M. 2006. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:296-302.
- De Robertis, E.M., and H. Kuroda. 2004. Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos. *Annual review of cell and developmental biology*. 20:285-308.
- De Robertis, E.M., O. Wessely, M. Oelgeschlager, B. Brizuela, E. Pera, J. Larrain, J. Abreu, and D. Bachiller. 2001. Molecular mechanisms of cell-cell signaling by the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol*. 45:189-197.
- Deblandre, G.A., D.A. Wettstein, N. Koyano-Nakagawa, and C. Kintner. 1999. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of Xenopus embryos. *Development*. 126:4715-4728.
- Delaune, E., P. Lemaire, and L. Kodjabachian. 2005. Neural induction in Xenopus requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*. 132:299-310.
- Derynck, R., Y. Zhang, and X.H. Feng. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 95:737-740.

- Dubaissi, E., and N. Papalopulu. 2011. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Dis Model Mech.* 4:179-192.
- Eom, D.S., S. Amarnath, J.L. Fogel, and S. Agarwala. 2011. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development.* 138:3179-3188.
- Eom, D.S., S. Amarnath, J.L. Fogel, and S. Agarwala. 2012. Bone morphogenetic proteins regulate hinge point formation during neural tube closure by dynamic modulation of apicobasal polarity. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology.* 94:804-816.
- Fagotto, F., K. Guger, and B.M. Gumbiner. 1997. Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. *Development.* 124:453-460.
- Gamell, C., A.G. Susperregui, O. Bernard, J.L. Rosa, and F. Ventura. 2011. The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration. *PloS one.* 6:e16477.
- Itoh, F., S. Itoh, M.J. Goumans, G. Valdimarsdottir, T. Iso, G.P. Dotto, Y. Hamamori, L. Kedes, M. Kato, and P. ten Dijke Pt. 2004. Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *The EMBO journal.* 23:541-551.
- Komatsu, Y., V. Kaartinen, and Y. Mishina. 2011. Cell cycle arrest in node cells governs ciliogenesis at the node to break left-right symmetry. *Development.* 138:3915-3920.
- Kurisaki, K., A. Kurisaki, U. Valcourt, A.A. Terentiev, K. Pardali, P. Ten Dijke, C.H. Heldin, J. Ericsson, and A. Moustakas. 2003. Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 23:4494-4510.
- Lee, K.H., S. Evans, T.Y. Ruan, and A.B. Lassar. 2004. SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer. *Development.* 131:4709-4723.
- Lewis, J. 2003. Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Current biology : CB.* 13:1398-1408.
- Marcet, B., B. Chevalier, G. Luxardi, C. Coraux, L.E. Zaragosi, M. Cibois, K. Robbe-Sermesant, T. Jolly, B. Cardinaud, C. Moreilhon, L. Giovannini-Chami, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, R. Waldmann, L. Kodjabachian, and P. Barbry. 2011. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology.* 13:693-699.
- Marchal, L., G. Luxardi, V. Thome, and L. Kodjabachian. 2009. BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106:17437-17442.
- Olivares, G.H., H. Carrasco, F. Aroca, L. Carvallo, F. Segovia, and J. Larrain. 2009. Syndecan-1 regulates BMP signaling and dorso-ventral patterning of the ectoderm during early *Xenopus* development. *Developmental biology.* 329:338-349.
- Ossipova, O., J. Tabler, J.B. Green, and S.Y. Sokol. 2007. PAR1 specifies ciliated cells in vertebrate ectoderm downstream of aPKC. *Development.* 134:4297-4306.
- Plouhinec, J.L., L. Zakin, and E.M. De Robertis. 2011. Systems control of BMP morphogen flow in vertebrate embryos. *Curr Opin Genet Dev.* 21:696-703.
- Quigley, I.K., J.L. Stubbs, and C. Kintner. 2011. Specification of ion transport cells in the *Xenopus* larval skin. *Development.* 138:705-714.

- Rankin, S.A., J. Kormish, M. Kofron, A. Jegga, and A.M. Zorn. 2011. A gene regulatory network controlling *hhx* transcription in the anterior endoderm of the organizer. *Developmental biology*. 351:297-310.
- Rider, C.C., and B. Mulloy. 2010. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *The Biochemical journal*. 429:1-12.
- Schuff, M., D. Siegel, M. Philipp, K. Bundschu, N. Heymann, C. Donow, and W. Knochel. 2012. Characterization of *Danio rerio* Nanog and functional comparison to *Xenopus* Vents. *Stem cells and development*. 21:1225-1238.
- Sirour, C., M. Hidalgo, V. Bello, N. Buisson, T. Darribere, and N. Moreau. 2011. Dystroglycan is involved in skin morphogenesis downstream of the Notch signaling pathway. *Molecular biology of the cell*. 22:2957-2969.
- Stubbs, J.L., L. Davidson, R. Keller, and C. Kintner. 2006. Radial intercalation of ciliated cells during *Xenopus* skin development. *Development*. 133:2507-2515.
- Stubbs, J.L., I. Oishi, J.C. Izpisua Belmonte, and C. Kintner. 2008. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nature genetics*. 40:1454-1460.
- Stubbs, J.L., E.K. Vladar, J.D. Axelrod, and C. Kintner. 2012. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nature cell biology*. 14:140-147.
- Takizawa, T., W. Ochiai, K. Nakashima, and T. Taga. 2003. Enhanced gene activation by Notch and BMP signaling cross-talk. *Nucleic acids research*. 31:5723-5731.
- Teel, A.L., and H.J. Yost. 1996. Embryonic expression patterns of *Xenopus* syndecans. *Mechanisms of development*. 59:115-127.
- Werner, M.E., and B.J. Mitchell. 2013. Using *Xenopus* skin to study cilia development and function. *Methods in enzymology*. 525:191-217.
- Yoshida, Y., S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda, and T. Yamamoto. 2000. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*. 103:1085-1097.
- Yoshida, Y., A. von Bubnoff, N. Ikematsu, I.L. Blitz, J.K. Tsuzuku, E.H. Yoshida, H. Umemori, K. Miyazono, T. Yamamoto, and K.W. Cho. 2003. Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling. *Mechanisms of development*. 120:629-637.

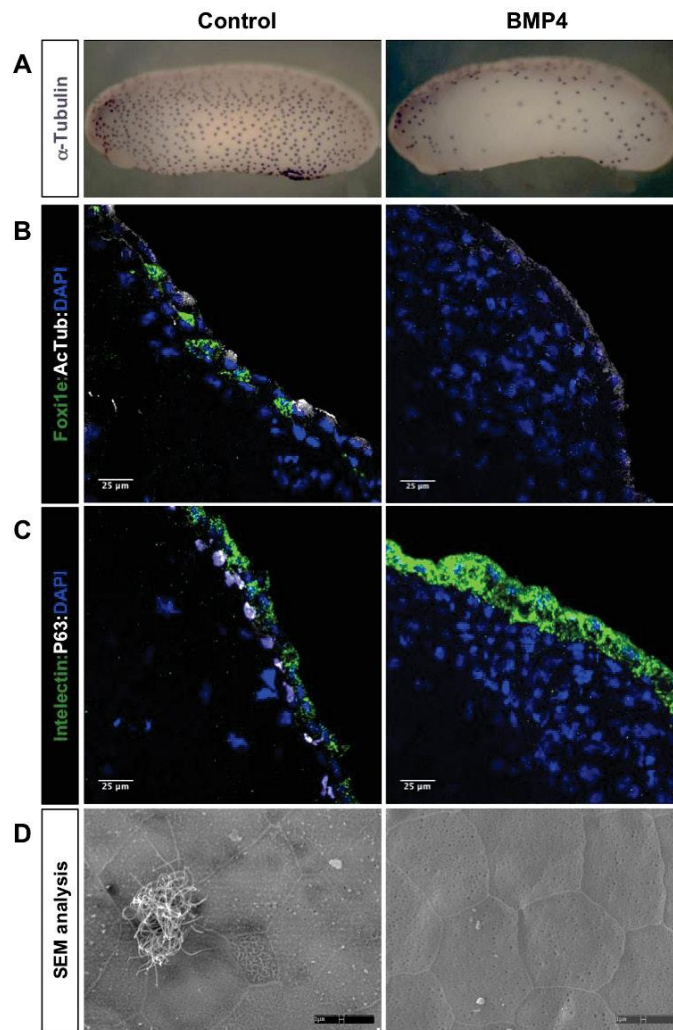


Figure 1: BMP4 strikingly represses all the internal layer cell fates

Embryos were injected either with control (left side) or BMP4 protein (right side). Whole mount ISH shows a strong decrease in the number of α -Tubulin positive cells (A). FISH for Foxi1e to stain ionocytes, and IHC for Acetylated α -Tubulin to stain ciliated cells (B) and FISH for Intelectin to stain goblet cells and IHC for P63 to stain basal cells (C) revealed that the three internal fates of the epidermis do not emerge. By opposition, goblet cells are still specified. Using SEM on stage 37 embryos, we confirmed that only goblet cells are present at the surface of the tissue and that they look functional (D).

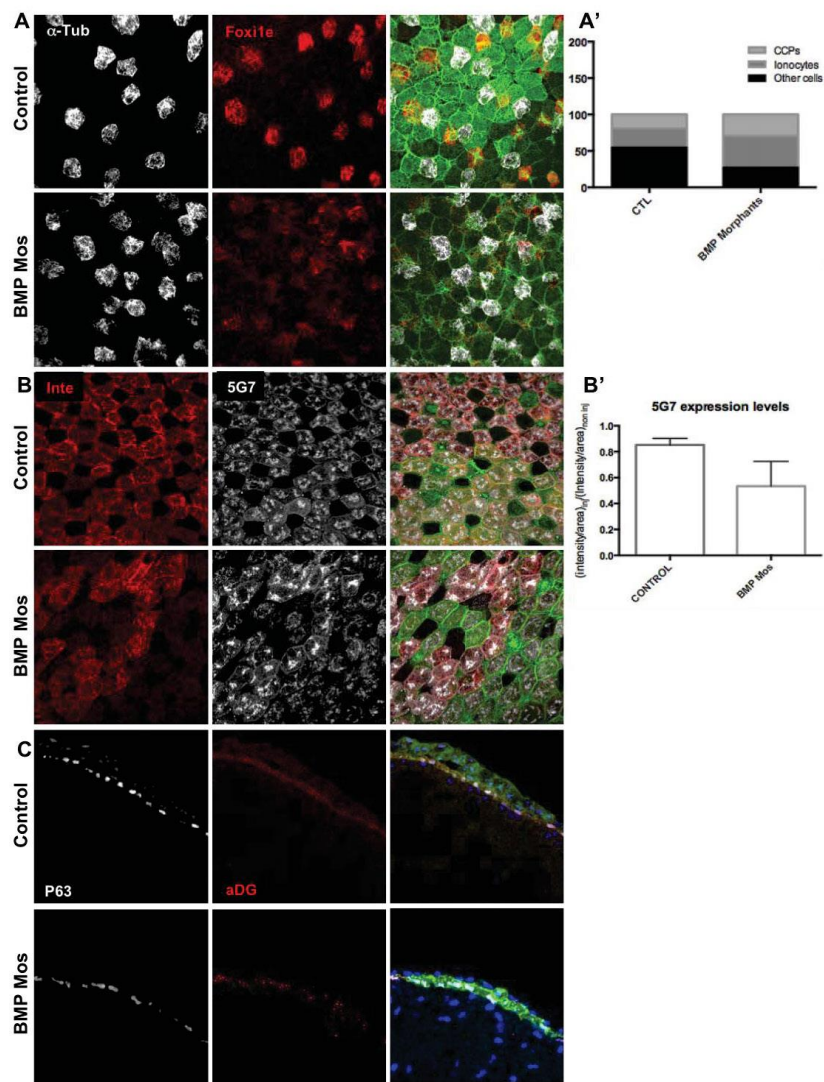


Figure 2: Inhibition of BMP pathway promotes intercalating cells

Embryos were injected with mGFP only (control) or with a mix of BMP2, 4 and 7 morpholinos (BMP MOs). Double FISH for α -Tub and Foxi1e to count ciliated cells and ionocytes precursors have been made. Counter staining with mGFP, the injection tracer, allowed quantitative analysis of the experiments shown on the graph A'. The number of ciliated, α -Tub positive, cells and ionocytes, Foxi1e positive, cells is given as a percentage of the total number of injected cells. FISH for intelectin and IHC for 5G7 showed defects in the specification of goblet cells (B) Quantification of the strength of the fluorescence signal have been made for 5G7 signal and are shown in B'. The inner layer cells are still specified as shown by the P63 staining, but the cells are not completely specified as they expressed lower levels of aDG compared to control (C).

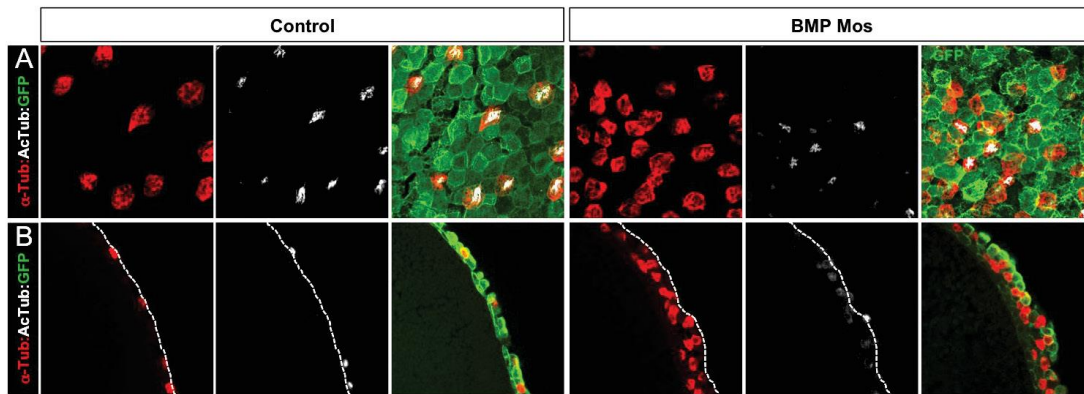


Figure 3: BMP morphants exhibit intercalation defects;

mGFP was injected alone (Control, left side) or coinjected with BMP 2 4 and 7 morpholinos (BMP Mos, right side). Ciliated cells were stained using α-Tubulin probe in FISH and cilia were stained with acetylated α-Tubulin antibody. Embryos were either explanted (A) or sectioned (B) to appreciate the intercalation defects induced by BMP inhibition

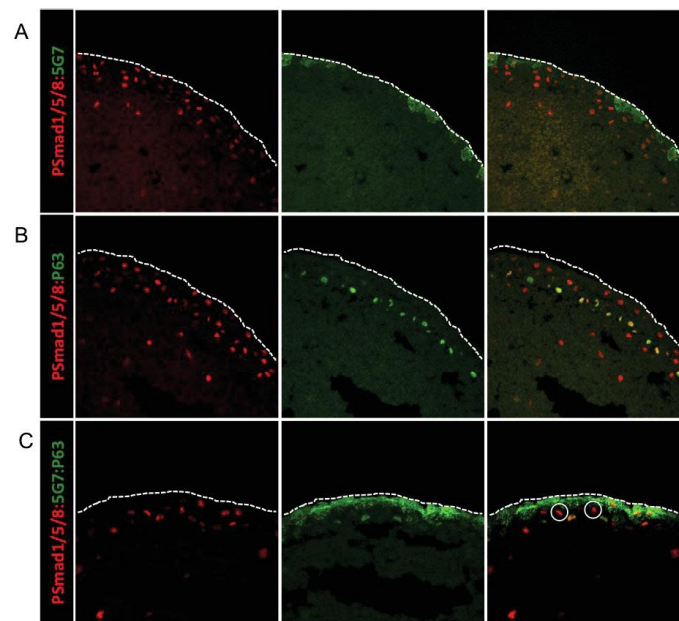


Figure 4: All cell fates experience BMP activation

Stage 14 embryos were sectioned and stained for P-Smad1/5/8 and 5G7 (A), P-Smad1/5/8 and P63 (B) or P-Smad1/5/8, 5G7 and P63 (C). 5G7 and P63 antibodies are both mouse antibodies revealed together on panel C. Both 5G7 and P63 positive cells are also P-Smad1/5/8 positive and as circled in white on the panel C, intercalating cells, negative for P63 and 5G7 can also be positive

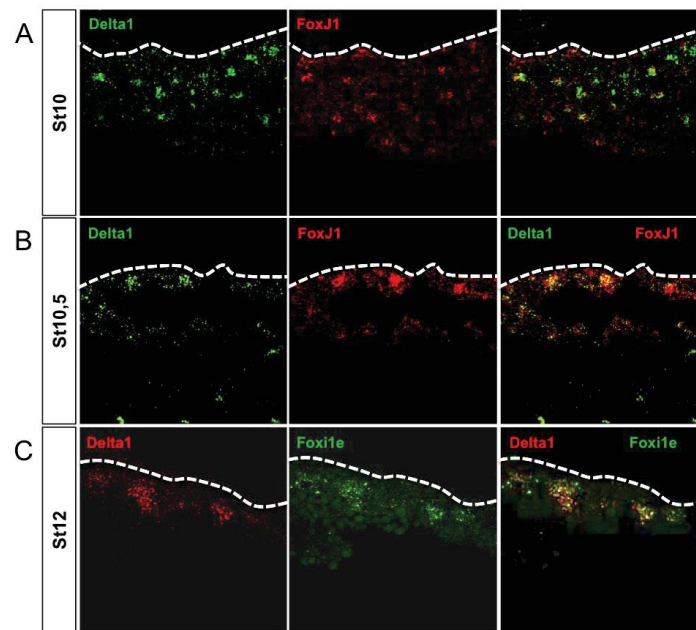


Figure 5: Delta 1 is expressed first in ciliated cells precursors and second in ionocytes
 Double FISH staining for FoxJ1 and Delta1 (A and B) confirmed that Delta1 is expressed in the ciliated cells from stage 10 (A) to 12. Delta1 is then coexpressed with Foxi1e, and therefore in ionocytes precursors (C).

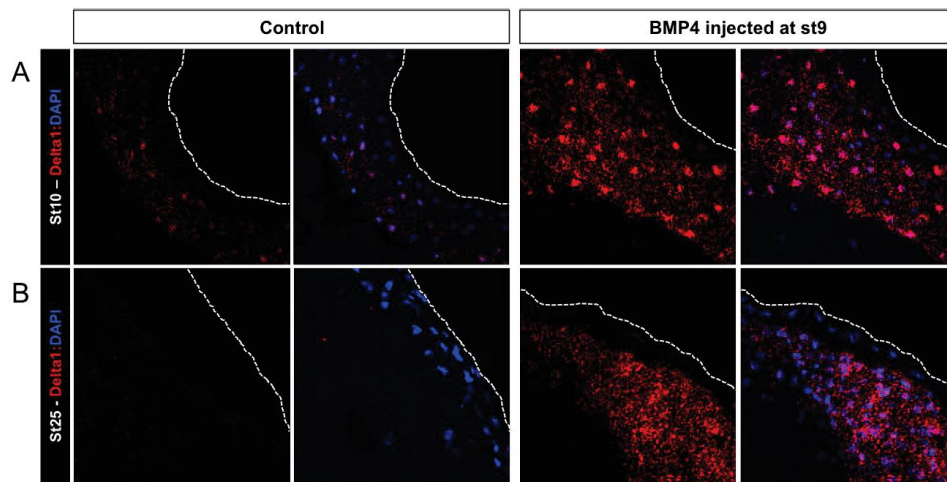


Figure 6: BMP strongly induces Delta1 long lasting expression in the inner layer
 Control (left side) and BMP4 injected embryos (right side) were analysed for Delta1 expression by FISH at stage 10 (A) and stage 25 (B). BMP4 injected embryos show a strong induction of Delta1 expression in the inner layer compare to control.

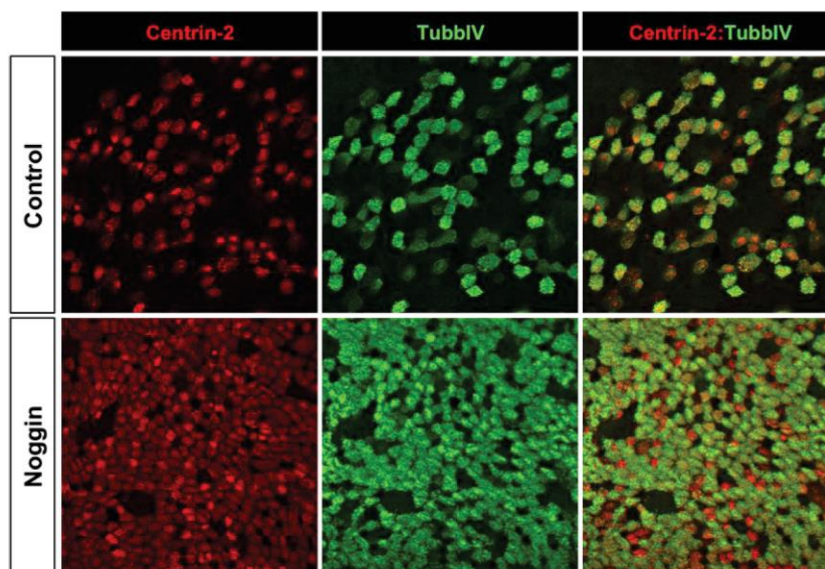


Figure H1: BMP pathway is not required for ciliogenesis.
Control HAECs culture (upper panel) and Noggin treated one (lower panel) have been stained for Centrin-2 in red, and B4 tubulin in green, showing that Noggin strongly induces ciliated cells production.

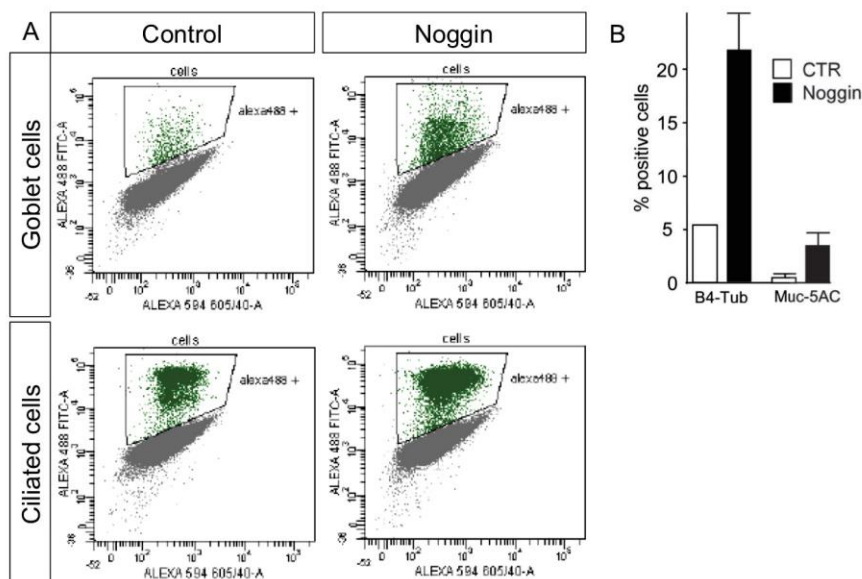


Figure H2: Noggin induces regeneration of mucociliary epithelium.

A. FACS analysis of ciliated cells (lower panel) and mucus secreting cells(upper panel) in control HAECs culture (left panel) and Noggin treated one (right panel). Tubb-IV antibody was used for ciliated cells detection and Muc5AC antibody for mucus secreting cells detection.

B. Graphs represent the quantification of FACS detection in both conditions.

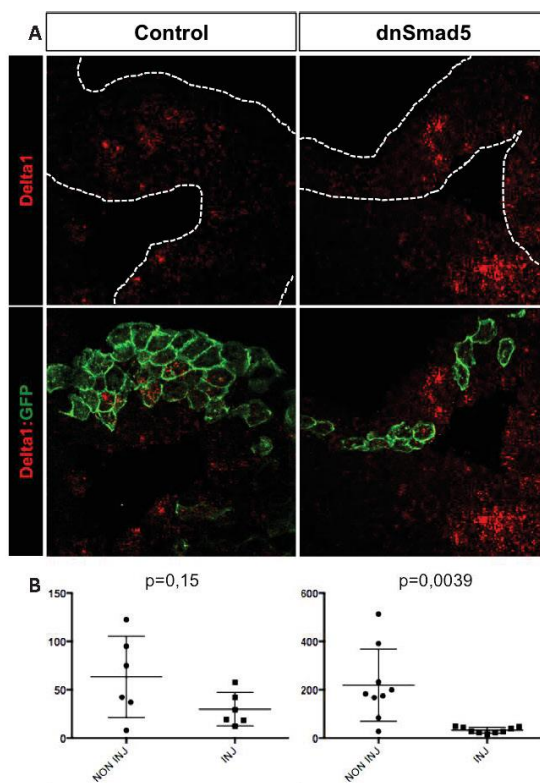


Figure 7: Unphosphorylable form of Smad5 inhibits Delta1 expression.

A. Embryos were injected with mGFP alone (Control, left side) or coinjected with dnSmad5 mRNA (dnSmad5, right side). Transverse sections, across the injected area of the epidermis were made in order to have (i) only epidermis and (ii) both injected and non-injected zones. Fluorescence was quantified on several sections per embryo and on several embryos per experiment.

B. Quantifications are shown on the graphs in the lower line. Injection of dnSmad5 significantly decreases Delta1 expression.

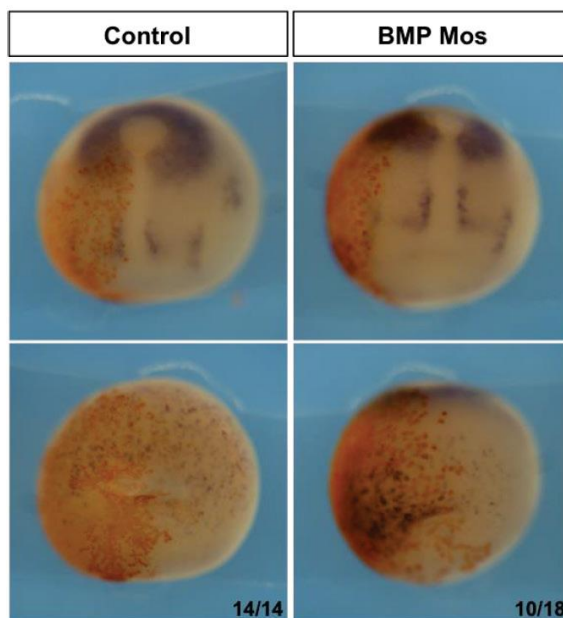


Figure 8: BMP morphants present more delta1 positive cells at stage 12

In situ hybridization of DLL1 in embryo
 injected alone (Control, left side) or coinjected with BMP 2 4 and 7 morpholinos (BMP Mos, right side).

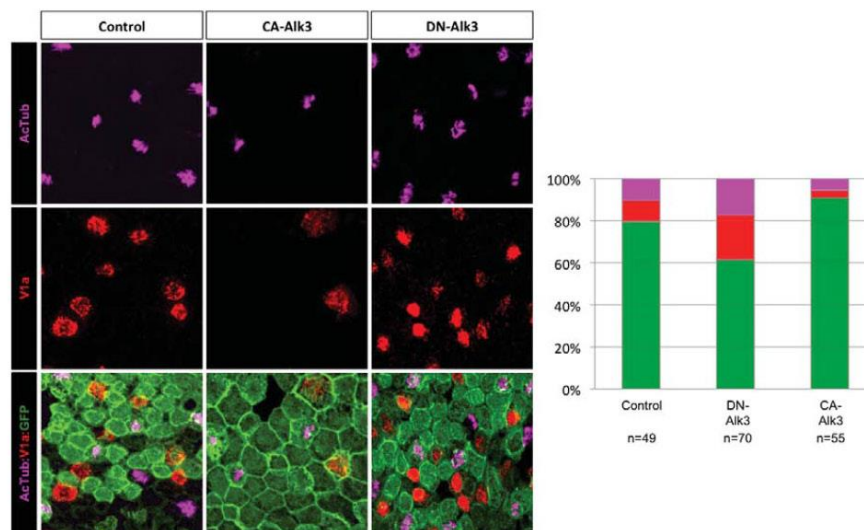


Figure S1: BMP effect on cell fate is a cell autonomous effect. mGFP was injected alone (left panel) or coinjected with either CA-Alk3 (central panel) or DN-Alk3 (right panel). Ciliated cells were stained using acetylated α -tubulin antibody. Ionocytes were stained with the V1a probe. Quantifications are in percentages of ciliated cells (magenta) and ionocytes (red) on the total number of injected cells. CA and DN-Alk3 induced respectively a reduction and an increase in the number of cells of these two types, demonstrating the cell autonomous effect of the pathway on the cell fate decisions.

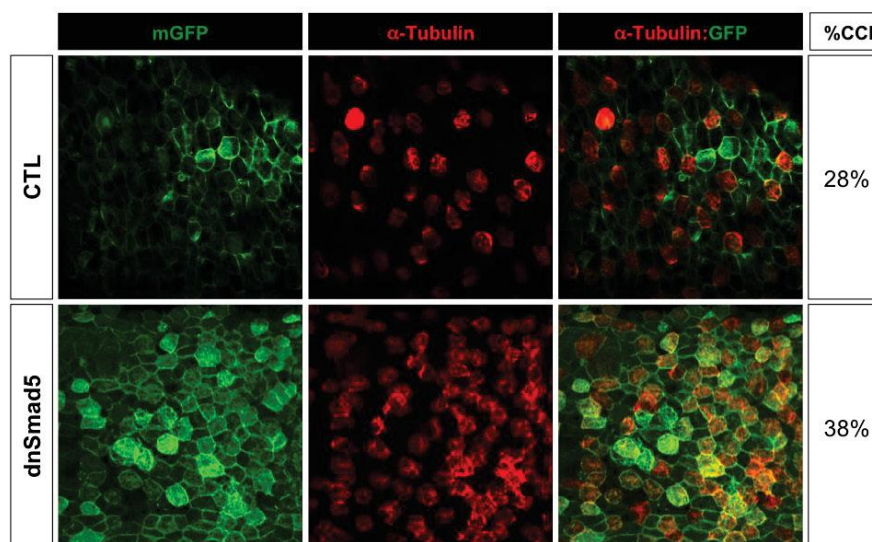


Figure S2: This effect of the inhibition of BMP on the ciliated fate is transcriptional mGFP was injected alone (upper panel) or coinjected with dnSmad5 (lower panel) and ciliated cells were stained using α -Tubulin probe in FISH. The number of ciliated cells is increased in the dnSmad5 injected embryos compare to controls, percentage of ciliated cells are noted on the right side, indicating that the effect of BMP inhibition is linked to its transcriptional activity.

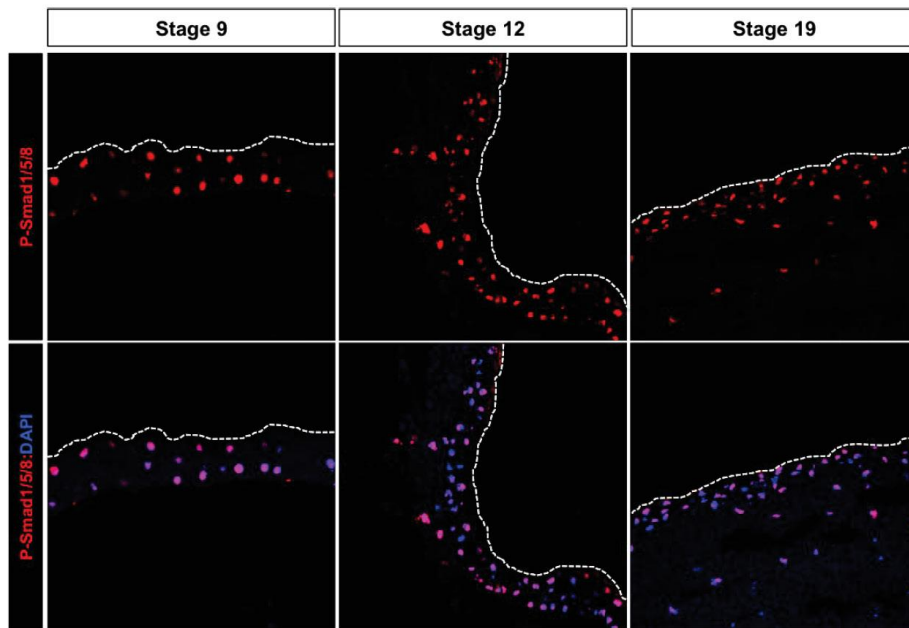


Figure S3: BMP pathway is ubiquitously activated during epidermis development.

We analysed P-Smad1/5/8 expression pattern during epidermis development on embryos sections from stage 9 to 22 \$. Here are represented three of these stages, 9, 12 and 19. P-Smad1/5/8 is expressed in most of the epidermis cells.

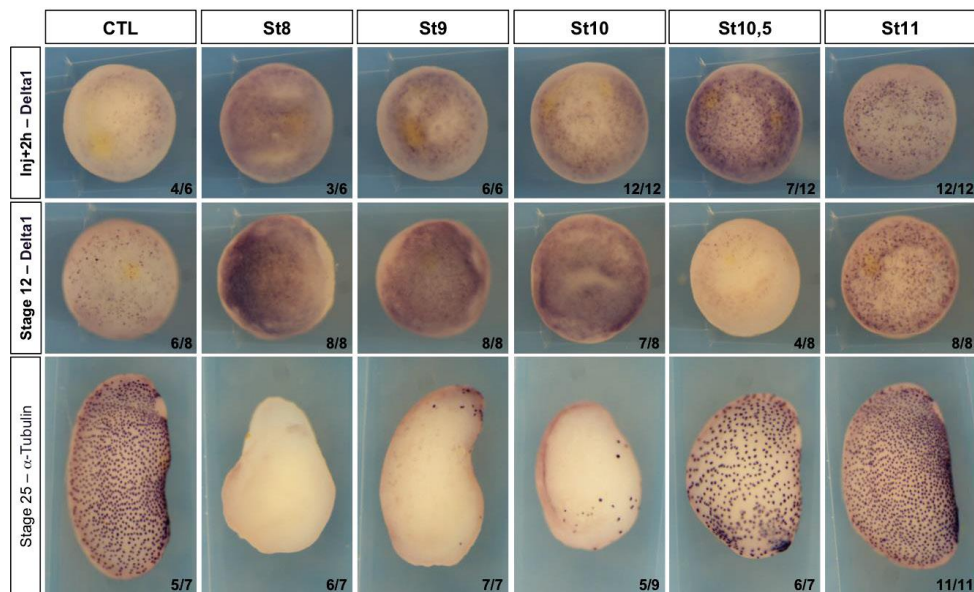


Figure S4: Induction of Delta1 and inhibition of ciliated fate by BMP4 is transient.

Embryos were injected with control solution of BSA at stage 8 (CTL) or with BMP 4 protein at the stage indicated above the pictures. Delta1 expression levels were analysed 2 hours after the injection (upper panel) or at stage 12 (middle panel). BMP4 is able to induce Delta1 if injected before stage 10,5. The transient induction of Delta1 is correlated with transient inhibition of ciliated cells specification, as shown here with the ISH α-Tubulin on stage 25 embryos (lower panel).

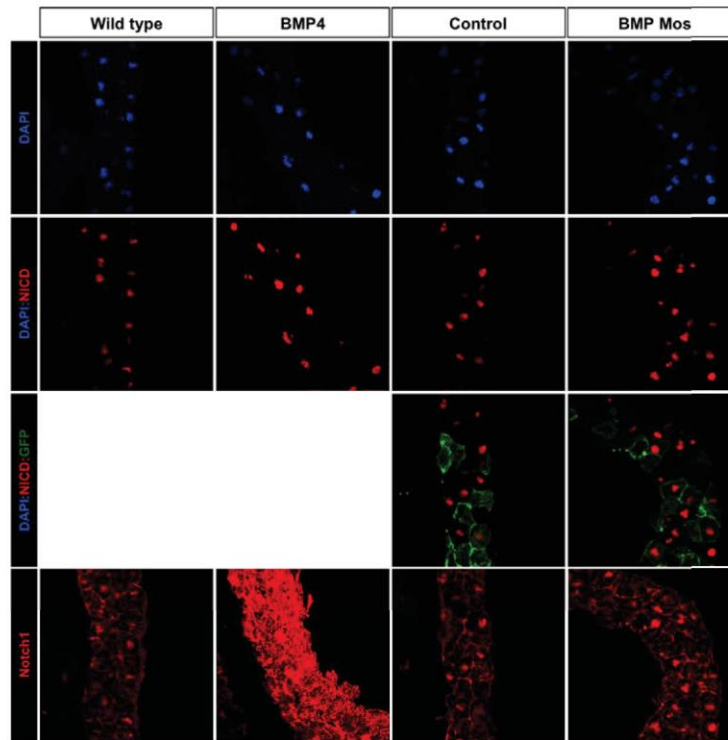


Figure S5: NICD nuclear level do not seem to be distribute by BMP modulation at stage 10.

Discussion & Perspectives

Mon travail de thèse a mis en lumière le rôle physiologique complexe joué par les miARN de la famille miR-449 (miR-449a/b/c, collectivement appelés miR-449) et les voies de signalisation qu'ils régulent dans le contrôle de la biogénèse des cils motiles chez les vertébrés.

MiR-449 contrôle la multiciliogénèse.

Expression de miR-449

MiR-449 est fortement et spécifiquement exprimé dans les cellules multiciliées (MCC) de l'épithélium respiratoire humain, de l'épiderme ou du néphrostome de l'embryon de Xénope. Dans ces deux espèces, l'invalidation de miR-449 bloque la différenciation des MCC tandis qu'aucun défaut d'asymétrie droite/gauche lors de l'organogenèse n'est observé. Ce dernier processus est contrôlé par le cil nodal, un cil motile unique exprimé à la surface des cellules recouvrant le « gastrocele roof plate », structure embryonnaire (cf. partie II. 3. B. 2)) au sein de laquelle aucune expression de miR-449 n'est détectée (Marcet et al., 2011b). Nos résultats associent donc spécifiquement l'expression et le rôle de miR-449 aux cellules possédant une multitude de cils motiles. Foxj1 est un facteur de transcription clé de la ciliogénèse qui est exprimé dans les cellules possédant un ou plusieurs cils motiles et est détecté chez le Xénope aussi bien dans l'épiderme, le néphrostome que dans le « gastrocele roof plate », comme indiqué par l'observation de *situs inversus* lors de son invalidation (Stubbs et al., 2008). Dans le néphrostome et dans l'épiderme de Xénope, l'invalidation de miR-449 n'abolit pas l'expression de Foxj1. La présence de Foxj1 dans les cellules monociliées du « gastrocele roof plate » a permis de suggérer que d'autres facteurs additionnels étaient requis pour induire la différenciation des MCC (Stubbs et al., 2008). Nos observations distinguent le rôle de miR-449 de celui de Foxj1 : notre étude suggère que miR-449 serait l'un de ces facteurs jouant un rôle central dans la multiciliogénèse (Marcet et al., 2011b).

L'arrêt du cycle cellulaire

Le premier événement nécessaire à la multiciliogénèse est un arrêt du cycle définitif. La première fonction de miR-449 qui a été caractérisée dans d'autres modèles est de bloquer le cycle cellulaire (Bou Kheir et al., 2011; Feng and Yu, 2010; Lize et al., 2010b; Marcet et al., 2011b). En accord avec ces observations, nous avons montré que l'expression de miR-449 dans des cellules respiratoires humaines en prolifération entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Marcet et al., 2011b). Par ailleurs, dans notre modèle humain de différenciation miR-449 réprime spécifiquement l'expression de nombreux acteurs du cycle cellulaire. En revanche, nous avons constaté que l'invalidation de miR-

449 au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain, une fois la confluence cellulaire atteinte, ou dans l'épiderme d'embryon de Xénope n'affecte ni la prolifération ni l'apoptose. Ces résultats suggèrent qu'une fois l'épithélium formé, l'inhibition de contact est suffisante pour bloquer la prolifération cellulaire même si miR-449 est bloqué. En outre, l'expression de miR-449 et de son gène hôte CDC20B est induite au moment même où les cellules épithéliales stoppent leur phase de prolifération cellulaire comme révélé par certains marqueurs de prolifération (par exemple le transcrit MKI67 codant pour la protéine Ki67). L'ensemble de nos données confirme donc le rôle de miR-449 dans l'arrêt du cycle cellulaire à un niveau précoce de la différenciation (cf. partie III. 1. E).

Contrôle des voies Notch et BMP au cours de la multiciliogenèse : rôle de miR-449 ?

Nos résultats indiquent que l'inhibition de la voie Notch par miR-449 est nécessaire pour la multiciliogénèse dans nos deux modèles.

Contrôle de la voie Notch par miR-449 dans l'épithélium respiratoire humain

miR-449 réprime directement l'expression à la fois du ligand DLL1 et de son récepteur Notch1 au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain (Marcet et al., 2011a; Marcet et al., 2011b). DLL1 et Notch1 sont absents dans les MCC (cellules multiciliées) et ne demeurent alors exprimés que dans les cellules non-ciliées avoisinantes, qui sont alors susceptibles de stimuler la voie Notch dans les cellules adjacentes telles que les MCC (Marcet et al., 2011b). C'est pourquoi une inhibition permanente de Notch1 par miR-449 au sein des MCC est alors indispensable pour maintenir un phénotype multicilié. Cette hypothèse pourra être évaluée par la stimulation de l'épithélium respiratoire avec du ligand DLL1 qui ne devrait pas induire de perte des MCC qui n'expriment pas de Notch1. En revanche, l'expression de la forme clivée intracellulaire de Notch1 (NICD) par infection lentivirale dans l'épithélium respiratoire différencié pourrait nous permettre d'observer si une réactivation de la voie Notch pourrait induire une dédifférenciation de ces MCC.

Rôle de la régulation de DLL1 par miR-449 dans l'épiderme de Xénope.

La manipulation expérimentale du modèle Xénope étant plus accessible, les mécanismes moléculaires peuvent être plus précisément étudiés (Deblandre et al., 1999; Marcet et al., 2011b; Marnellos et al., 2000; Stubbs et al., 2006; Stubbs et al., 2012). Dans l'épiderme de Xénope, la spécification des MCC implique le mécanisme d'inhibition latérale de la voie Notch (Marnellos et al., 2000) (cf. partie III.2.A). L'activation de la voie Notch par injection du NICD dans l'épiderme bloque la spécification des CCP (progéniteurs des cellules multiciliées) indiquant que l'inactivation de la voie Notch est nécessaire pour la spécification des CCP (Deblandre et al., 1999; Marnellos et al., 2000). Les

transcrits DLL1 sont transitoirement détectés dans les CCP, avant l'apparition des marqueurs spécifiques des MCC. L'injection de DLL1, qui par cis-inhibition bloque l'activation de la voie Notch, conduit à l'apparition de la spécification des CCP mais bloque leur différenciation terminale. La régulation de DLL1 à cette étape est nécessaire pour initier la différenciation terminale des MCC (Deblandre et al., 1999; Marcet et al., 2011b). Dans ce contexte, nous avons montré que miR-449 est nécessaire une fois la spécification effectuée pour réguler DLL1 dans les CCP et donc pour induire la différenciation terminale des CCP en MCC. Ici, deux mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer pourquoi l'inhibition de DLL1 par miR-449 dans les CCP est nécessaire pour stimuler la multiciliogénèse chez le Xénope :

- Soit DLL1 active la signalisation Notch dans les cellules adjacentes aux progéniteurs, qui à leur tour peuvent produire un signal paracrine réprimant la différenciation terminale des progéniteurs. Un processus analogue a d'ailleurs déjà été observé dans l'épithélium respiratoire humain où TFF3 (Trefoil Factor 3), une protéine sécrétée par les cellules à mucus est nécessaire pour la différenciation des MCC (LeSimple et al., 2007).
- Soit DLL1 peut réprimer la différenciation des progéniteurs par une voie autocrine.

Ainsi, la régulation de DLL1 induit la différenciation des MCC par un mécanisme qui reste à élucider. Nos derniers résultats montrent une augmentation séquentielle de DLL1 dans les CCP et dans les progéniteurs des ionocytes au niveau de la couche interne de l'épiderme de Xénope (cf. partie résultats Article 5). L'activation de la voie Notch est connue pour bloquer la spécification à la fois des MCC et des ionocytes (Deblandre et al., 1999). La répression de DLL1 par miR-449 dans les CCP induit l'arrêt de l'activation de la voie Notch dans les cellules réceptrices avoisinantes. Cet arrêt d'activation de la voie Notch est potentiellement nécessaire pour la spécification des ionocytes du fait notamment de l'expression séquentielle de DLL1 (cf. partie résultats Article 5). En effet, l'inactivation de la voie Notch dans des cellules voisines pourrait induire l'expression progressive de DLL1 dans les progéniteurs des ionocytes (cf. partie résultats Article 5). Dans ces conditions, les ionocytes apparaissent comme de bons candidats pour la production d'un signal paracrine empêchant la différenciation terminale des MCC. Pour confirmer cette hypothèse, la protection de DLL1 contre l'action de miR-449 pourrait permettre d'observer un maintien de l'expression DLL1 dans les CCP et d'étudier ainsi l'effet sur la spécification des ionocytes dans ces conditions.

Régulation de Notch1 par miR-449 dans l'épiderme de Xénope : vers un modèle conservé de l'action de miR-449 ?

La répression directe de Notch1 par miR-449 est nécessaire pour la différenciation de l'épithélium respiratoire humain (Marcet et al., 2011b). Chez le Xénope, la répression directe de DLL1

par miR-449 serait l'événement majeur. Nonobstant, au moins deux raisons laissent suggérer que miR-449 pourrait aussi cibler Notch1 dans l'épiderme de Xénope :

- D'une part et de façon inattendue et non expliquée, l'inactivation de miR-449 dans l'épiderme de Xénope, induit une augmentation de DLL1 dans la plupart des cellules de l'épiderme et donc l'apparition d'un nombre important de CCP. Cette observation indique tout d'abord une absence de régulation de DLL1 par miR-449 empêchant la différenciation terminale des CCP comme montré (Marcet et al., 2011b). Néanmoins, cette forte augmentation de la spécification en MCC est similaire à une altération du patron de spécification contrôlé par l'inhibition latérale (Deblandre et al., 1999; Marnellos et al., 2000). Cet effet peut indiquer un autre rôle de miR-449 à une étape plus précoce que la régulation de DLL1 (cf. figure 35). En effet, l'absence de la régulation de Notch1 dans les futures MCC pourrait potentialiser l'activation de Notch1, connu pour inhiber l'expression de DLL1 dans ces mêmes cellules. Cette baisse de DLL1 induirait ainsi une diminution dans les cellules avoisinantes de l'activation de Notch *via* l'inhibition latérale aboutissant à l'augmentation de la formation de cellules DLL1 positives. On aurait alors une altération du patron avec l'apparition potentielle d'un nombre plus important de CCP comme observé (cf. partie Résultats Article 1) (Marcet et al., 2011b).
- D'autre part, quand les progéniteurs des ionocytes expriment à leur tour DLL1, le ciblage de Notch1 par miR-449 dans les MCC empêcherait un signal retour de la voie Notch dans les MCC qui pourrait affecter la différenciation des MCC.

Ainsi ces différents éléments suggèrent que chez le Xénope miR-449 contrôlerait dans un premier temps la formation du patron de spécification des CCP en réprimant Notch1 et dans un deuxième temps induirait la différenciation terminale des CCP en MCC en réprimant DLL1 (Marcet et al., 2011b). Pour confirmer cette hypothèse, de nombreuses évidences expérimentales supplémentaires doivent être apportées. Tout d'abord, il faut déterminer l'impact fonctionnel de la protection de Notch1 contre l'action de miR-449. Deux situations sont alors envisageables :

- Soit miR-449 ne cible pas Notch1 et alors la protection de Notch1 contre l'action de miR-449 n'aura aucun effet ni sur la spécification ni sur la différenciation terminale. En effet, le patron de spécification ne sera pas altéré et DLL1 sera toujours ciblé par miR-449 permettant la différenciation terminale des MCC (cf. figure 35).
- Soit miR-449 cible Notch1, et alors la protection de Notch1 contre l'action de miR-449 pourrait paradoxalement provoquer une augmentation de la différenciation des MCC : l'absence de répression de Notch1 induit par sa protection provoquera une altération du patron de

A.

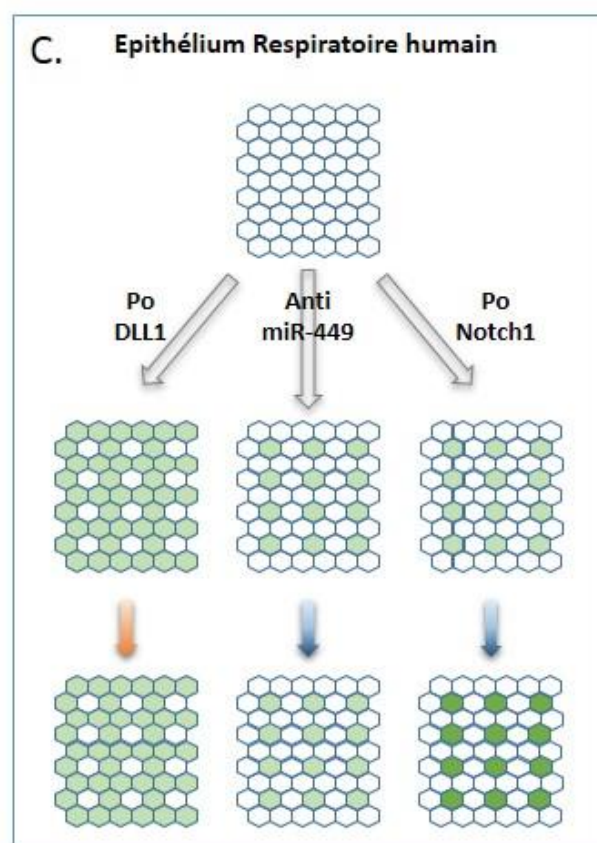
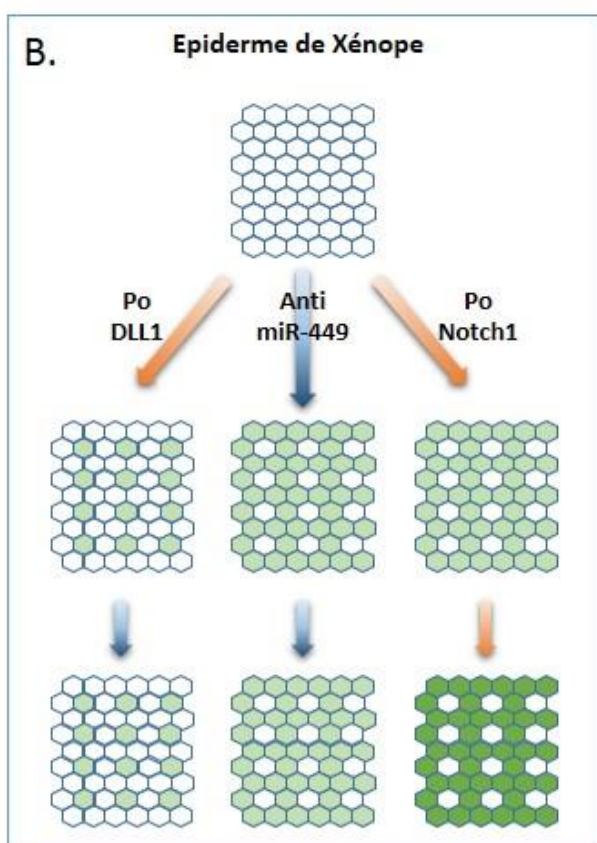
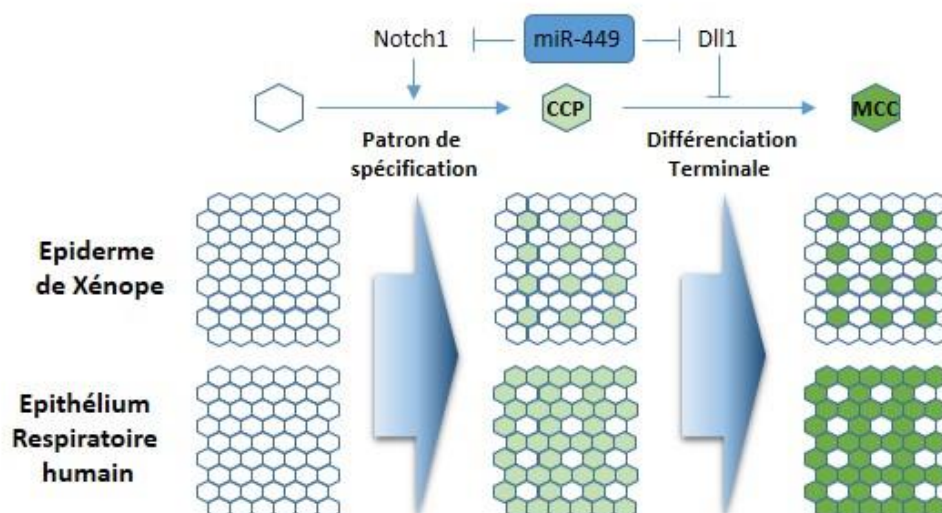


Figure 35: Modèle récapitulatif des phénotypes d'après notre modèle d'action de miR-449

A. Effet de la latérale inhibition sur la patron de spécification chez le Xénope et chez l'Homme avec le passage de cellules indifférenciées (fond blanc) en progéniteurs de cellules multiciliées (CCP)(fond vert clair). Dans un deuxième temps le régulation de DLL1 induit la différenciation terminale des CCP en cellules multiciliées (MCC)(fond vert foncé).

B. et C. Impact fonctionnel observé (flèche bleue) ou à définir (flèche rouge) en se basant sur notre modèle dans l'épiderme de Xénope et dans l'épithélium respiratoire humain. Chez l'Homme, l'étape de spécification n'est pas observable par manque de marqueurs précoces des CCP. Cette aspect non observable est représenté par des flèches à fond gris.

spécification avec une augmentation de la spécification en CCP, comme cela a été observé dans les morphants miR-449 (Marcet et al., 2011b). Cependant dans cette condition, et contrairement à l'invalidation de miR-449, miR-449 sera toujours capable de réprimer DLL1 et d'induire la différenciation terminale des MCC. L'augmentation du nombre de MCC sera ainsi représentative de l'augmentation du nombre de CCP (cf. figure 35).

D'autre part, la protection de DLL1 contre l'action de miR-449 abolit la multiciliogenèse indiquant bien que la répression de DLL1 par miR-449 affecte la différenciation terminale des MCC. Il reste néanmoins, à déterminer l'effet de la protection de DLL1 sur la spécification des CCP. Ces expériences associées à celles de la protection de Notch1, pourrait fournir des évidences supplémentaires pour savoir si miR-449 cible aussi Notch1. A nouveau, deux situations peuvent alors être envisagées lors de la protection de DLL1 :

- Soit miR-449 ne cible pas Notch1, et alors la différenciation terminale des MCC sera abolie par la protection de DLL1 sans que la spécification n'en soit affectée.
- Soit miR-449 cible Notch1, et alors la protection de DLL1 n'affectera pas la répression de Notch1 par miR-449 et le patron de spécification n'en sera pas affecté. L'arrêt de la différenciation terminale dans ces conditions sera le reflet du rôle de miR-449 sur DLL1 uniquement.

Confirmation du modèle chez l'Homme.

Il est à noter que des expériences similaires peuvent être effectuées chez l'Homme pour montrer que ce mécanisme proposé est conservé dans nos deux modèles.

Nous avons montré que la protection de Notch1 dans l'épithélium respiratoire humain bloque l'apparition des MCC. Mais comme chez le Xénope, le blocage de l'action de miR-449 sur Notch1 peut aussi induire une altération de l'inhibition latérale confirmant nos expériences où une diminution du nombre de MCC est observée. Si ce modèle est correct, la protection de DLL1 chez l'Homme aboutira au même phénotype que la protection de Notch1 avec une diminution de l'apparition des MCC. La différence entre ces deux protections viendra de l'étude des progéniteurs des MCC humaines : la protection de Notch1 induira une diminution de la spécification alors que la protection de DLL1 n'affectera pas la spécification. Malheureusement, aucun marqueur des progéniteurs des MCC n'est connu chez l'Homme à l'heure actuelle.

Dans nos deux modèles d'étude, la répression de la voie Notch par miR-449 est centrale, bien que des mécanismes distincts des deux espèces puissent être impliqués. Ces différences pourraient s'expliquer par la force de l'inhibition latérale influençant le patron de différenciation. En effet, l'inhibition latérale semble s'exercer de manière différente entre le Xénope et l'Homme. Dans nos deux

modèles, l'inhibition de la voie Notch induit la différenciation des MCC mais l'épithélium respiratoire humain est composé d'une grande majorité de MCC alors que dans l'épiderme de l'embryon de Xénope les MCC ne représentent qu'une part minoritaire des cellules de ce tissu.

En conclusion, je propose que miR-449 contrôle deux aspects distincts de la voie Notch :

Dans un premier temps, la régulation de Notch1 permet d'établir par l'inhibition latérale le patron de spécification de l'épiderme de Xénope et de l'épithélium respiratoire humain. Dans un deuxième temps, la régulation de DLL1 dans les CCP permet la différenciation terminale en MCC. Cet aspect de régulation de la voie Notch, pourrait mettre en lumière un mécanisme précis de régulation de la voie Notch en deux étapes et ceci de manière conservée au cours de l'évolution.

Régulation de la voie BMP et cross-talk avec la voie Notch : implication de miR-449 ?

Une interaction étroite entre la voie Notch et la voie BMP a déjà été décrite dans d'autres systèmes. Dans nos modèles d'étude, nous avons montré que la voie BMP intervient plus précocement dans la différenciation des cellules multiciliées et module l'activité de la voie Notch en modulant l'expression de DLL1 (cf. partie résultats Article 5). L'activation de la voie BMP inhibe l'apparition des CCP, bloque la multiciliogénèse et induit une augmentation d'expression de DLL1. Au contraire, l'inhibition de la voie BMP induit très fortement la différenciation des MCC associée à une forte diminution d'expression de DLL1. Ainsi nous avons observé que la voie BMP pouvait moduler la voie Notch en régulant l'expression de DLL1. N'ayant retrouvé aucun site de fixation de SMAD (facteurs de transcription induits par la voie BMP) sur la région promotrice de DLL1, nous supposons que cet effet est indirect. MiR-449 étant un régulateur majeur de la voie Notch au cours de la multiciliogénèse, on peut alors se demander si la voie BMP contrôle de manière directe l'expression de miR-449. Cela suggérerait qu'en réponse à l'inhibition de la voie BMP, l'expression de miR-449 serait induite et agirait directement sur l'inhibition de DLL1 pour déclencher la différenciation terminale des MCC. MiR-449 apparaît alors comme un interactant possible reliant les voies BMP et Notch au cours de la multiciliogénèse. Ici, il serait intéressant d'invalider miR-449 lors du blocage de la voie BMP afin de confirmer que miR-449 promeut la multiciliogénèse sous le contrôle de la voie BMP.

Remodelage du cytosquelette d'actine

Le deuxième événement requis pour la biogénèse des cils motiles est la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine. Ce mécanisme nécessite l'activation de la petite GTPase RhoA par un mécanisme dépendant de Foxj1 (Pan et al., 2007). Cette activation entraîne une cascade de signalisation *via* des kinases effectrices de RhoA notamment Rock1 qui induit la phosphorylation des ERM, des protéines de liaison à l'actine. Dans les MCC, les ERM sont localisées au pôle apical par des mécanismes encore peu connus et une fois phosphorylées changent de conformation permettant leur

interaction avec l'actine (Algrain et al., 1993). Ces ERM servent de piliers à de l'architecture cellulaire en faisant le lien entre le réseau d'actine et la membrane des cellules épithéliales (Saotome et al., 2004). Dans les MCC, parmi les ERM, l'ézrine est phosphorylée et localise au pôle apical de la cellule où l'enrichissement d'actine est retrouvé (Huang et al., 2003; Pan et al., 2007). Nos résultats indiquent que la surexpression de miR-449 induit une augmentation du nombre de fibres de stress d'actine dans les cellules en prolifération tandis que son invalidation abolit la formation du réseau apical d'actine dans les progéniteurs des MCC dans les deux espèces. De plus, miR-449 induit une élévation de l'activité de RhoA et de la phosphorylation de l'ézrine, suggérant un rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Par des approches de transcriptome et d'analyses *in silico*, nous avons déterminé deux cibles de miR-449, RhoGDI2 et R-Ras, reliées aux petites GTPases et au cytosquelette d'actine. RhoGDI2, une protéine inhibitrice de l'activation de RhoA (Cherfils and Zeghouf, 2013; Garcia-Mata et al., 2011), est une cible directe de miR-449 dans les MCC. Néanmoins, trois écueils nous ont empêché de déterminer RhoGDI2 comme une cible conservée et fonctionnelle de miR-449 dans le remodelage apical d'actine. Tout d'abord, l'invalidation de RhoGDI2 par des siARN n'a pas été suffisante pour induire une augmentation de l'activité de RhoA. Ensuite, la protection de RhoGDI2 contre l'action de miR-449 n'a pas aboli le remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la multiciliogénèse. Enfin, RhoGDI2 ne semble pas être une cible conservée chez le Xénope. Ces résultats nous suggèrent que miR-449 pourrait aussi cibler d'autres régulateurs de l'activité de RhoA qui pourraient compenser l'absence de RhoGDI2. Par exemple, la protéine Arhgap1 est connue pour potentialiser l'hydrolyse de l'ATP entraînant ainsi une diminution de l'activité de RhoA (Mori et al., 2009). Arhgap1 est une autre cible potentielle de miR-449 dont le transcrit est fortement diminué par la surexpression de miR-449. L'absence d'effet sur l'activité de RhoA de l'invalidation spécifique de RhoGDI2 pourrait être expliquée par la présence d'Arhgap1. MiR-449 contrôlerait donc l'activité de RhoA en ciblant simultanément plusieurs régulateurs. Chez le Xénope aussi, miR-449 pourrait cibler d'autres régulateurs de RhoA encore non identifiés.

R-Ras est la deuxième cible de miR-449 que nous avons identifié et caractérisé comme conservée chez l'Homme et le Xénope. La protection de R-Ras contre l'action de miR-449 bloque le remodelage du cytosquelette d'actine et la multiciliogénèse dans nos deux modèles. De manière intéressante, l'invalidation de R-Ras à un stade précoce de la différenciation abolit aussi la multiciliogénèse dans les deux espèces. Nos résultats indiquent que l'expression précoce de R-Ras est requise pour la différenciation en cellules multiciliées, et que sa répression par miR-449 à une étape plus tardive est indispensable pour la réorganisation apicale du cytosquelette d'actine et le déclenchement de la multiciliogénèse. A ce stade de notre étude, nous n'avons pas déterminé de manière précise le mécanisme moléculaire sous-jacent. Il a été montré que la voie Notch contrôlait l'activité de R-Ras (Hodkinson et al., 2007). Cependant, nous pouvons soutenir que l'effet observé dans

notre modèle n'est pas dû à l'inhibition de la voie Notch par miR-449, mais bien à l'action directe de miR-449 sur l'inhibition de l'expression de R-Ras. En effet, miR-449 abolit complètement l'expression de R-Ras, rendant inutile le contrôle de l'activité d'une protéine par la voie Notch alors que cette même protéine n'est plus exprimée par la cellule.

En outre, R-Ras est capable d'interagir avec la filamine A, une protéine cytoplasmique impliquée dans le positionnement des filaments d'actine (Calderwood et al., 2001). Cette interaction est nécessaire au maintien de la perméabilité de l'endothélium (Griffiths et al., 2011). On peut émettre l'hypothèse qu'un rôle similaire pourrait exister au cours de la multiciliogénèse. Des résultats préliminaires nous indiquent que la filamine A est exprimée de manière homogène dans le cytoplasme des cellules basales de l'épithélium respiratoire humain tandis que son expression dans les MCC serait restreinte au pôle apical à proximité des corps basaux (cf. figure 36A et B).

Dans ce contexte, une étude récente a montré que la filamine A interagit avec la Meckelin (TMEM67) et que l'altération de cette interaction par l'invalidation de la filamine A ou de la Meckelin induit des défauts de ciliogénèse du cil primaire et de positionnement du corps basal (Adams et al., 2012). Lors de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain nous observons une forte induction de la Meckelin (cf. figure 36C), et la base de données « Human Protein Atlas » suggère une expression apicale de la Meckelin dans les cellules cylindriques de l'épithélium respiratoire nasal (cf. figure 36D). Il est connu que l'action des filamines passe par leur association avec d'autres partenaires moléculaires, et que des compétitions entre ces différents partenaires existent de façon à moduler son rôle dans une cellule (Nakamura et al., 2011). Les expériences de protection de cible indiquent que R-Ras doit être spécifiquement réprimée par miR-449 dans les futures MCC pour induire la réorganisation apicale d'actine et déclencher la formation des cils motiles. Aussi l'effet de l'invalidation de R-Ras affecte la différenciation des cellules multiciliées. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est que l'interaction de R-Ras avec la filamine A est nécessaire dans d'autres types cellulaires ou en début de différenciation. Nous émettons ainsi l'hypothèse que miR-449 en ciblant R-Ras de manière spécifique dans les cellules multiciliées, induit un changement de partenaire de la filamine A, hypothétiquement avec la Meckelin, de manière spécifique aux cellules multiciliées. Ainsi pour affirmer cette hypothèse, des expériences d'immuno-précipitations de la filamine A pourraient permettre d'identifier les différents partenaires de la filamine A au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire et d'observer si la Meckelin qui est induite à ce moment-là interagit avec la filamine A au moment où R-Ras est réprimée. Mais dans un premier temps la localisation cellulaire par immunofluorescence de la Meckelin pourrait par déjà nous indiquer si son expression est restreinte aux MCC, et aussi si elle colocalise avec la filamine A.

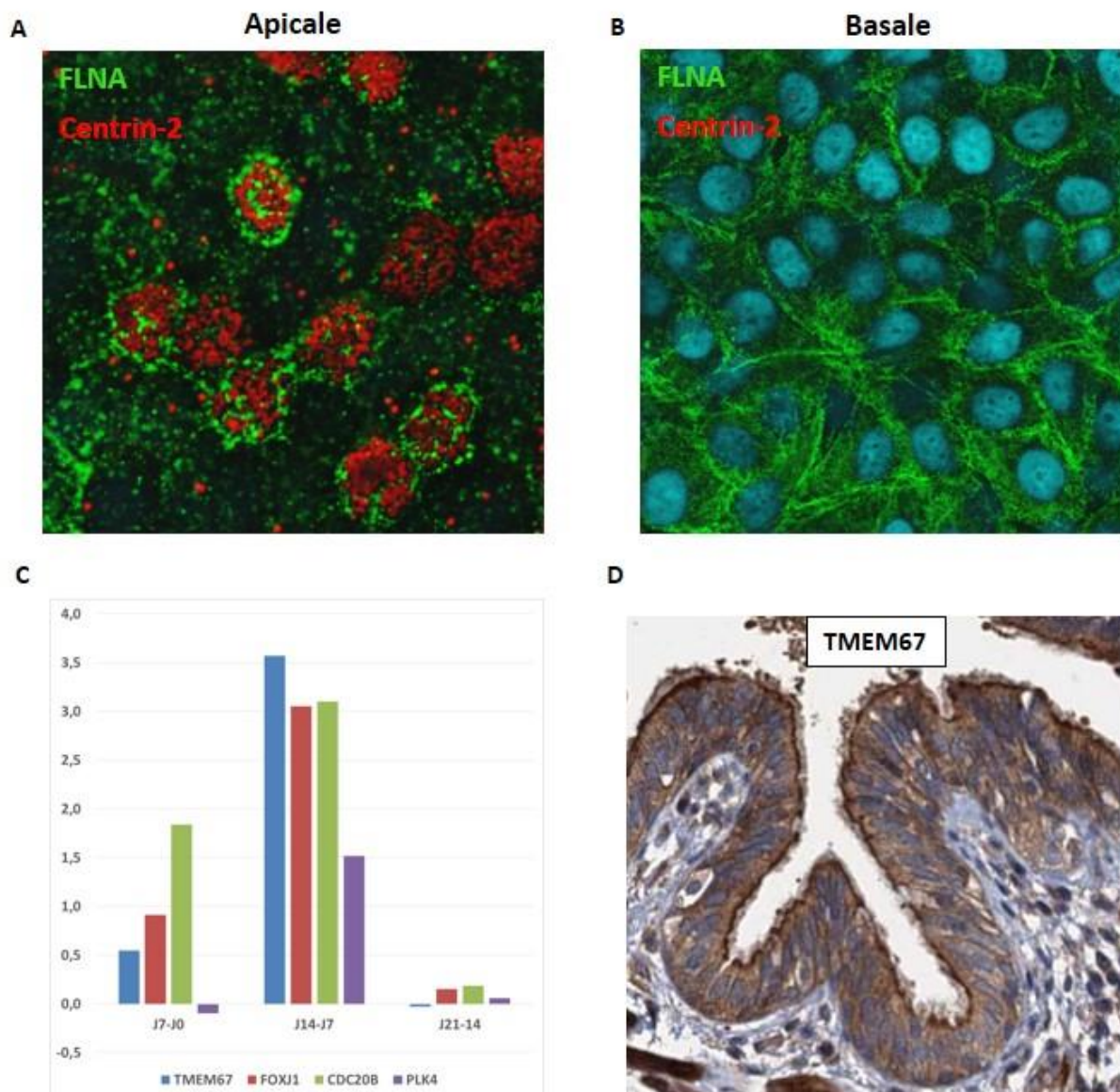


Figure 36: Localisation de la Filamine A et rôle potentiel avec la Meckelin

A. et B. Des immunofluorescences de l'épithélium respiratoire humain différencié en condition Air-Liquide, avec des anticorps dirigés contre la FLNA (Filamine A) et contre un marqueur des corps basaux (Centrin-2) indiquent une localisation aux corps basaux dans les cellules multiciliées (A) alors qu'on observe une localisation plus homogène dans les cellules basales (B).

C. Des immunohistochimie de TMEM67 (Meckelin) sont disponible sur la base de données en ligne « Human Protein Atlas » (www.proteinatlas.org). Ces marquages indiquent une localisation apicale de TMEM67 au niveau des cellules cylindriques de l'épithélium respiratoire humain nasal.

D. Résultats de puces transcriptomique (cf. Tableau1) pour les sondes correspondantes à TMEM67 (bleu) avec d'autres marqueurs de la multiplication des corps basaux et des cils (Foxj1 et Plk4 en rouge et violet respectivement) et CDC20B en vert.

MiR-449 et multiplication des centrioles

D'autres événements indispensables à la multiciliogénèse sont la multiplication des centrioles, leur migration et leur ancrage à la membrane apicale afin de former les corps basaux nécessaires pour l'élongation de l'axonème des cils. L'invalidation de miR-449 bloque la multiciliogénèse ainsi que la multiplication des corps basaux, dérivés des centrioles, suggérant un rôle précoce de miR-449 dans la multiplication des corps basaux (Marcet et al., 2011b). Néanmoins, il nous manque des arguments déterminants pour relier directement miR-449 à la centriologénèse.

Chez le Xénope, l'invalidation de miR-449 est effectuée par l'injection de morpholinos dirigés contre miR-449 (MO-449) dans l'épiderme au stade blastomère bien avant l'apparition des MCC. Lors de l'observation des MCC à des stades plus tardifs dans les morphants-449, il est remarqué que le traceur co-injecté avec MO-449 est dilué sur les bords de la zone injectée. Cela est potentiellement dû soit aux divisions cellulaires successives entraînant une dilution du « pool » injecté à chaque division soit à un effet de diffusion dans l'épiderme. De manière étonnante, il a été remarqué (données non publiées) que dans ces zones peu injectées et donc moins concentrées en MO-449, les cellules forment des cils motiles mais avec un nombre de cils par cellules moins important que dans les parties non injectées. Ces zones correspondent à des cellules ayant moins de MO-449 et donc des niveaux de miR-449 encore libre moins importants mais encore présents, permettant ainsi d'effectuer la multiciliogénèse de façon partielle. Cet effet observé est techniquement difficile à étudier, dû à la sensibilité de détection des niveaux de miR-449 en hybridation *in situ*, mais peut potentiellement révéler le rôle de miR-449 dans la multiplication des centrioles. Une des hypothèses que l'on peut formuler serait que la quantité de miR-449 est proportionnelle au nombre de corps basaux et donc de cils observés. Plusieurs approches sont en cours de réalisation pour évaluer cet effet. Nous avons alors cherché à évaluer l'effet de miR-449 sur la multiplication des centrioles. La déplétion totale de miR-449 n'apporte ici aucune information puisqu'elle abolit totalement la multiciliogénèse. Chez l'Homme, la surexpression de miR-449, à une étape précoce de prolifération avant la différenciation de l'épithélium respiratoire, induit une forte diminution du nombre de MCC (données non publiées). Il est probable que cet effet soit associé à un blocage trop précoce de la prolifération par miR-449. Cet effet dépendant du cycle cellulaire empêche l'épithélium d'atteindre la confluence et d'établir sa polarisation ainsi que son étanchéité, une étape indispensable pour que la différenciation de l'épithélium respiratoire se poursuive. Chez le Xénope, ces expériences n'ont pas été effectuées mais on peut aussi imaginer un retard de développement de l'épiderme à moins d'avoir recours à des injections à des stades plus tardifs. En effet, seules des modulations de miR-449 directement dans les CCP permettraient de voir l'impact de miR-449 dans le contrôle du nombre de cils motiles par cellules. Cette approche peut être envisageable chez le Xénope mais est complexe à mettre en œuvre dans le

modèle humain, nécessitant l'utilisation de constructions lentivirales pour pallier à la difficulté de transfection de ce modèle par des approches classique en liposomes qui ne sont efficaces que sur des cellules en prolifération.

Nous avons donc utilisé une autre approche en parallèle pour évaluer le rôle de miR-449 dans la centriologénèse. La multiplication des centrioles est étroitement reliée à la phase S du cycle cellulaire (Hinchcliffe and Sluder, 2001). De nombreuses publications ont étudié le rôle de certains acteurs comme PLK4 (Holland et al., 2012) dans ce processus à partir de nombreuses lignées cellulaires (e.g. cellules CHO et Hela par exemple). Nous avons alors utilisé ces lignées cellulaires pour évaluer l'impact de miR-449 dans la multiplication du nombre de centrioles. Dans nos mains, la surexpression de miR-449 n'induit une multiplication du nombre de centrioles que dans un faible nombre de cellules. MiR-449 induit un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 lors de la synchronisation des cellules par déplétion en sérum. Comme miR-449 réprime de nombreuses cibles impliquées à différentes étapes du cycle cellulaire, il n'est pas impossible que dans certains types cellulaires, miR-449 induise un arrêt des cellules à différentes étapes du cycle cellulaire, comme cela vient d'être montré avec miR-34c (qui appartient à la même famille que miR-449 (cf. partie III. 1. E), qui induit une augmentation des cellules en phase S (Wu et al., 2013). Nous pouvons alors émettre trois hypothèses pour expliquer le faible rendement de miR-449 sur la multiplication des centrioles dans nos expériences :

- soit miR-449 n'a pas d'effet sur la multiplication des centrioles et l'augmentation observée dans une faible proportion de cellules correspond aux cellules arrêtées en phase S à ce moment-là et qui ont commencé une multiplication de centrioles de manière indépendante de la surexpression de miR-449.
- soit en plus de l'arrêt en phase S de certaines cellules, miR-449 induit une multiplication de centrioles. Mais afin détecter un effet potentiel de miR-449 sur la multiplication de centrioles, il est nécessaire de comparer le nombre de centrioles par cellule lors d'un arrêt en phase S avec celui obtenu lors de la surexpression de miR-449.
- la surexpression de miR-449 pourrait induire de l'apoptose entraînant des marquages aspécifiques augmentant la détection de centriole « faux positifs ».
- ou alors des marquages aspécifiques des centrioles dus à la qualité de l'anticorps ou de la technique d'immunofluorescence.

Pour pallier ces deux derniers points, de nombreux laboratoires ont recours pour quantifier les centrioles à des lignées stables exprimant la centrine-2 fusionnée avec une protéine fluorescente et utilisent en plus un autre marqueur du centriole par immunofluorescence [20]. Ainsi pour réellement évaluer l'effet de miR-449 dans la multiplication des centrioles, nous avons commencé à

mettre au point ce type lignée cellulaire. Pour répondre aux deux premiers points et s'affranchir de l'effet de miR-449 sur le cycle cellulaire, il est possible d'induire artificiellement une multiplication de centrioles, grâce à un traitement par de l'hydroxyurée qui bloque les cellules en phase S (Kuriyama et al., 2007), une étape du cycle cellulaire où s'enclenche la multiplication des centrioles. Ainsi la surexpression de miR-449 avec un traitement préalable à l'hydroxyurée dans les lignées étiquetées centrine-2, permettra de répondre à cette hypothèse. Cependant il ne faut pas oublier que de nombreux facteurs nécessaires à l'action de miR-449 dans le contexte de la multiciliogénèse peuvent être absents dans des lignées cellulaires classiques, rendant ainsi nos approches *in vivo* plus fiables.

Enfin, miR-449 est inclus dans l'intron 2 de son gène hôte codant pour la protéine CDC20B. De manière remarquable, nous avons montré que CDC20B colocalise dans l'épithélium respiratoire humain avec les corps basaux des MCC. Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'un rôle synergique ou complémentaire dans la multiciliogénèse entre miR-449 et son gène hôte CDC20B.

Rôle d'un locus conservé chez les vertébrés dans la multiciliogénèse

De manière conservée chez les vertébrés, le cluster miR-449 est situé dans l'intron 2 du gène codant pour la protéine CDC20B dont le rôle est encore inconnu. CDC20B est lui-même contenu chez l'Homme dans le locus 5q11. Ce locus semble être conservé chez tous les vertébrés étudiés. L'analyse de l'expression de CDC20B au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain ainsi que dans l'épiderme d'embryon de Xénope indique une forte induction de CDC20B lors de l'apparition des MCC. Chez l'Homme, CDC20B colocalise avec la centrine-2, un marqueur des corps basaux. On observe au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain une induction concomitante de CDC20B avec certains facteurs clés de la multiciliogénèse comme Foxj1 et PLK4 (cf. figure 36C). Des résultats préliminaires d'invalidation de CDC20B obtenus dans nos deux modèles indiquent que cette protéine pourrait être un acteur important pour la mise en place des corps basaux dans les MCC. Chez l'Homme l'invalidation et la surexpression de CDC20B au cours de la différenciation respiratoire, montre de manière encore inexpliquée un impact sur la transcription de nombreux acteurs clés de la ciliogénèse (FOXJ1, PLK4...). Une des perspectives à court terme du laboratoire est de déterminer dans nos deux modèles d'étude le rôle de CDC20B au cours de la multiciliogénèse.

De manière intéressante, sur ce même locus 5q11 chez l'homme, on remarque la présence de la protéine CCNO, qui est induit en même temps que CDC20B au cours de la différenciation et dont la fonction est inconnue. Plus récemment, le gène MCIDAS (multiciline) aussi situé dans ce locus, a été montré conservé chez la souris et chez le Xénope comme un acteur important lors de la multiciliogénèse (Stubbs et al., 2012). MCIDAS est contrôlé directement par la voie Notch, et des

expériences d'inactivation de la MCIDAS bloquent la formation des MCC alors que sa surexpression induit une différenciation en MCC malgré l'activation de la voie Notch (Stubbs et al., 2012). De manière similaire à CDC20B, MCIDAS est capable aussi d'activer la transcription de certains gènes cibles comme le facteur de transcription FOXJ1. Nos résultats indiquent que les membres de ce locus (CDC20B, miR-449, CCNO et MCIDAS) sont régulés de manière synchrone au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain (données non publiées). Ces observations soulèvent de nombreuses questions quant au rôle de chaque membre de ce locus lors de la multiciliogénèse. Il est à noter que l'inactivation de miR-449 n'affecte pas l'expression de FOXJ1 suggérant que MCIDAS et CDC20B pourraient jouer un rôle d'inducteur de FOXJ1. Le sauvetage de la multiciliogénèse par la surexpression de MCIDAS lors de l'activation de la voie Notch suggère que les autres membres du locus ne sont pas nécessaires pour la multiciliogénèse. Il n'est toutefois pas exclu que MCIDAS, qui possède une activité transcriptionnelle (Stubbs et al., 2012), puisse par une boucle d'auto-activation contrôler l'expression du locus « 5q11 » (MCIDAS/CDC20B/miR-449/CCNO) et induire ainsi la différenciation des MCC. Nos résultats démontrent aussi l'implication importante de miR-449 et probablement de CDC20B dans la multiciliogénèse, il semblerait donc que chaque membre de ce locus soit nécessaire pour la multiciliogénèse allant en faveur d'une régulation commune. En accord avec cette hypothèse, il a été découvert récemment une agénésie trachéale congénitale qui serait associée à la délétion du locus 5q11, montrant l'importance physiologique de ce locus dans la morphogénèse d'un tissu multicilié comme la trachée (de Jong et al., 2010). Une surexpression de MCIDAS dans nos modèles pourrait nous permettre d'évaluer son rôle dans le contrôle de l'expression de chacun des membres du locus 5q11 dont CDC20B et miR-449. Par ailleurs, nos observations montrant que CDC20B induit aussi des modifications transcriptionnelles, des expériences similaires seront envisagées.

Parmi d'autres acteurs susceptibles de contrôler l'expression des membres de ce locus, nous pourrions focaliser notre attention sur les facteurs de transcription FOXJ1, RFX, MYB, NICD ou SMAD dont leur rôle dans la multiciliogénèse est suspecté ou démontré. Une approche par ChIP-Seq aura l'avantage de rendre compte de l'implication de ces différents acteurs dans les modifications transcriptionnelles au cours de la différenciation des MCC. Ce type d'approche a par contre l'inconvénient d'être longue et fastidieuse, nécessitant des anticorps très spécifiques. Nous avons toutefois un avantage considérable du fait que ce locus est régulé de façon très contrôlée dans le temps et dans un type cellulaire unique. Ainsi chaque changement observé sur ce locus sera très informatif et révélateur d'une régulation précise. Depuis quelques années, avec le développement du séquençage à très haut débit (HTS), des approches anciennes ont été remises au goût du jour et notamment, les détections de sites sensibles à la DNase I. Cette approche permet après un traitement à la DNase I d'identifier par HTS les sites dits insensibles à la DNase et correspondant à des fractions

du génome protégées de la dégradation par les nucléosomes. De nombreuses études révèlent par ailleurs que ces sites sensibles à la DNase I reflètent assez bien l'état transcriptionnel de la cellule (Yaragatti et al., 2008). Mais de manière plus intéressante, au milieu de ces larges sites sensibles à la DNase I, il a été observé des pics suggérant une insensibilité ponctuelle à la DNases. Des études récentes montrent que ces sites insensibles à la DNase correspondent à la fixation de facteurs de transcription avec une très bonne résolution sur le site de fixation (Boyle et al., 2011). On peut ainsi envisager cette approche dans nos deux modèles en comparant simplement une condition dans laquelle miR-449 n'est pas exprimé à une condition en cours de différenciation où miR-449 est induit et ainsi identifier des régions régulatrices dont la sensibilité à la DNase I varie au cours de la différenciation. L'identification de ces sites devenus insensibles à la DNase nous permettra après une analyse bio-informatique d'identifier les facteurs impliqués dans la régulation de ce locus. Par la suite, la modulation de certaines voies comme Notch ou BMP (traitement Noggin, DAPT, siARN, morpholinos...) nous permettra d'observer comment ces sites évoluent vis-à-vis du traitement DNase I. Une fois le nombre de facteurs réduits ou identifiés, des approches de types ChIP-PCR/Seq pourront être effectuées pour confirmer l'action de certains régulateurs.

Rôle de la superfamille miR-34/449 dans la multiciliogénèse.

Parmi les miARN régulés au cours de la multiciliogénèse de vertébrés, la famille miR-449 était la plus fortement induite. A côté de cette famille, nous avons identifié la famille miR-34b/c qui est aussi fortement induite dans nos deux modèles, mais dans une moindre mesure que la famille miR-449 (cf. partie Résultats Article 1).

La famille miR-34 est composée de miR-34a situé sur le chromosome 1 et le cluster des miR-34b/c est localisé sur le chromosome 11. La famille miR-449 quant à elle est composée de 3 membres dérivant d'un même cluster : miR-449a, miR-449b et miR-449c. Ces miARN appartiennent à une même superfamille notée 34/449 car ils possèdent une séquence « seed » similaire sur la position 2 à 9 (cf. figure 37B). Néanmoins, la position de cette région « seed » de 8 mers au sein de cette famille est décalée de la position 2-9 pour miR-449c et miR-34b-5p : ces deux miARN possèdent un nucléotide supplémentaire en 5' décalant ainsi le « seed ».

Etant donné la forte similarité de séquences entre les miR-34 et les miR-449, nous avons étudié l'impact de l'expression de chacun des différents miARN de cette famille sur le transcriptome de cellules épithéliales en prolifération. Nous avons observé une très grande similitude d'effet entre les miR-34a, miR-34c-5p et les miR-449a/b (cf. figure 37A). De manière générale malgré des variations sur de la partie 3' du miARN, la règle du « seed » guide l'impact des miARN étudiés. Plus récemment, à

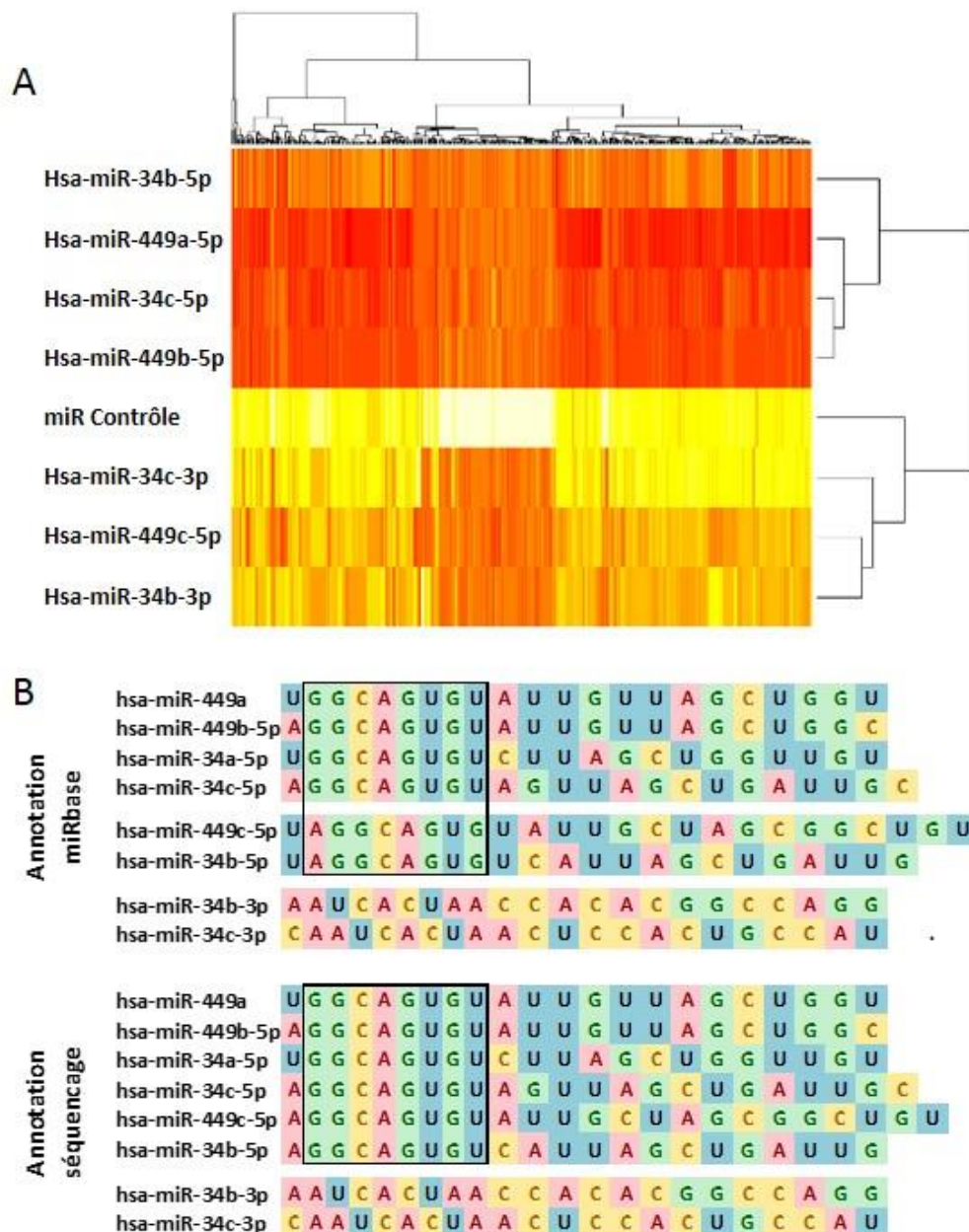


Figure 37: Impact transcriptomique du « seed » de la famille miR-34 et miR-449

a. Représentation en HeatMap de l'impact transcriptomique de la surexpression des membres de la famille miR-449 et miR-34 sur des cellules épithéliales en prolifération. Le gradient de couleur est représentatif de l'intensité d'un gène sur la puce à ADN: blanc quand il est faible et vers le rouge quand l'intensité détectée est plus forte.

b. Alignement des séquences basé sur les annotations de mirbase de la famille mir-34 et miR-449 (noté Annotation miRbase). Ré annotation des séquences de la famille miR-34 et miR-449 issue du séquençages obtenues à partir d'échantillons d'épithélium respiratoire humain (Annotation Séquençage). La région « seed » est représentée par un cadre noir.

l'issue du séquençage des petits ARN dans nos échantillons, l'analyse plus poussée des séquences révèle que les annotations de séquences issues de la base de données miRbase sont parfois inexactes. En effet, on observe que les miARN miR-449c-5p et miR-34b-5p ne possèdent pas de U en position 5' du miARN (cf. figure 37B). Cette modification de la séquence engendre ainsi un décalage du « seed » et un alignement parfait sur les autres membres de la famille. Au final, lorsque l'on regarde la conservation des séquences de miR-34/449 modifiée, on observe une parfaite conservation du « seed » (position 2-9). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il existe très probablement peu de différences entre les membres de la famille miR-34/449.

Chez les bilatériens, la principale caractéristique est la présence des gènes de développement HOX, qui régulent le développement différencié des organes d'avant en arrière ainsi que leur coordination avec le système nerveux. Ce système a permis l'apparition d'une anatomie différenciée. Les protostomes et les deutérostomes forment les deux subdivisions des bilatériens. Des expériences de séquençages chez des espèces représentatives des bilatériens ont permis d'identifier 34 miARN dits « ancestraux » communs aux protostomes et aux deutérostomes et donc présents chez l'ancêtre commun des bilatériens (Christodoulou et al., 2010). Parmi ces miARN on retrouve miR-34 qui, de façon absolument remarquable, est détecté dans les organes locomoteurs des bilatériens qui possède des cils motiles (Christodoulou et al., 2010).

A la suite de nos travaux soulignant le rôle conservé de miR-449 dans la multiciliogénèse chez les vertébrés, d'autres travaux ont montré un rôle similaire joué par miR-34b dans une autre espèce, le poisson zèbre (Wang et al., 2013). Dans le génome du poisson zèbre, la famille miR-34b a été retrouvée tandis que la famille miR-449 serait soit absente, soit plus probablement encore non annotée. Dans cette espèce, miR-34b est retrouvé fortement exprimé dans les MCC du néphrostome et est nécessaire pour la ciliogénèse en réprimant l'expression de c-myb (Wang et al., 2013). En effet, c-myb est induit à une étape précoce avant la ciliogénèse et son expression diminue sous l'effet de miR-34b lors de la ciliogénèse. De plus, un niveau trop important de c-myb ou une perte de c-myb affecte la ciliogénèse. Ainsi, miR-34b régulerait temporellement l'expression de c-myb de façon à effectuer le processus de ciliogénèse dans le néphrostome du poisson zèbre. Confortant les observations faites chez le poisson zèbre, c-myb a aussi été montré comme un acteur probable de la multiplication des centrioles chez la souris (Tan et al., 2013). Dans ce modèle aussi c-myb est induit précocement de manière transitoire au cours de la différenciation des MCC chez la souris, et contrôlerait directement l'expression de Foxj1 (Tan et al., 2013).

Les familles miR-34 et miR-449 possèdent de fortes similitudes de séquences et sont fortement conservées au cours de l'évolution (cf. figure 38A et B). Dans chaque famille de miARN étudiées, deux

zones sont retrouvées fortement conservées, correspondant à la région « seed » ainsi qu'à la région d'appariement en 3' du miARN, séparées les unes des autres par une partie non conservée (cf. figure 38A et B), deux régions de miARN connues pour participer à la reconnaissance des cibles (Grimson et al., 2007). Nos données ont permis de montrer que les deux familles miR-34 et miR-449 ont des effets relativement similaires sur le transcriptome des cellules respiratoires humaines, suggérant notamment l'importance du « seed » des miARN dans la spécificité de reconnaissance de cibles communes entre miR-34 et miR-449.

Ces différents éléments suggèrent que les miARN de la famille miR-34b/c seraient étroitement liés à la ciliogenèse, suggérant une possible complémentarité de ces deux familles de miARN dans ce processus. Cependant, chez le Xénope comme chez l'Homme, la famille miR-34b/c est aussi fortement induite au cours de la différenciation dans les MCC : une question fondamentale est de savoir pourquoi miR-34b/c et miR-449 sont-ils co-induits pour contrôler un même processus biologique ? A cet égard, on peut trouver intrigant que dans nos modèles l'invalidation de miR-449 affecte la multiciliogenèse alors que miR-34b/c qui ne semblent pas être affectés sont toujours présents mais ne compensent pas à l'évidence l'absence de miR-449.

- Une première explication serait un problème purement technique : la spécificité des inhibiteurs de miR-449 peut être mise en cause du fait de la similarité des séquences entre les deux familles de miARN. Pour valider l'efficacité d'un bloqueur de miARN, la meilleure solution consiste à observer l'absence de régulation de ses cibles, mais ici la tâche est compliquée car ces deux familles semblent partager la grande majorité de leur cibles. Une autre approche consiste à évaluer la détection du miARN d'intérêt par qPCR. Cette approche est cependant très discutée, car il est difficile de savoir avec certitude si la diminution observée du miARN d'intérêt (si elle existe) est due à l'association miR/inhibiteur physiologique dans la cellule ou alors si cette association miR/inhibiteur est un artefact favorisé par l'extraction des ARN. Dans nos expérimentations réalisées dans notre modèle humain, nous avons observé que l'invalidation de miR-449 s'accompagne d'une réduction significative de détection des miR-449a/b sans affecter significativement les niveaux de détection des miARN de la famille miR-34b/c, suggérant une spécificité d'action des antagomiR utilisés.

- Une deuxième explication est suggérée par les cinétiques d'induction des miR-449 et des miR-34b/c. Il est à noter que chez le poisson zèbre, l'invalidation de miR-34b n'abolit pas la centriogenèse contrairement à l'invalidation de miR-449 chez le Xénope et chez l'Homme (Marcet et al., 2011b; Wang et al., 2013). MiR-34b chez le poisson zèbre est décrit comme nécessaire pour la migration des corps basaux au pôle apicale de la cellule et son invalidation abolit ainsi la multiciliogenèse (Wang et al., 2013). Chez l'Homme, nous avons observé que miR-449 est induit avant miR-34b/c (Marcet et al., 2011b). On peut émettre l'hypothèse que dans ces modèles, miR-449 peut participer à la multiplication

des centrioles ainsi qu'à la différenciation des MCC, et que par la suite miR-34b/c interviennent dans une étape plus tardive de la différenciation, comme dans la migration des corps basaux par exemple.

Récemment, une souris invalidée pour miR-449 a été mise au point par Bao et collègues (Bao et al., 2012). Dans les testicules, miR-449 est fortement induit au cours de la spermatogénèse ainsi que miR-34b/c. L'étude se focalise sur la spermatogénèse et dans ce contexte le traitement des souris sauvage par du busulfan, connu pour abolir la spermatogénèse, affecte l'induction de miR-449. Dans les souris invalidées pour miR-449, une augmentation de la famille miR-34b/c est observée suggérant que cette augmentation sert à compenser la perte de la famille miR-449. Les auteurs indiquent que ces deux familles de miARN sont très similaires et que cet effet compensatoire empêche l'apparition d'infertilité chez ces souris. Malheureusement, ces travaux n'explorent pas le rôle potentiel de miR-449 dans la multiciliogénèse et s'il existe aussi dans ce contexte un effet compensatoire de miR-34b/c. Des résultats confirmant ces hypothèses chez des patients atteints d'infertilité masculine chez l'Homme ont été reportées plus récemment : dans le cas d'infertilité masculine d'origines histopathologiques différentes, la famille miR-449 ainsi que les miR-34b/c sont fortement diminués indiquant une perte de la spermatogénèse chez ces patients (Abu-Halima et al., 2013). Ces études suggèrent une certaine redondance et un effet compensatoire entre miR-34b/c et miR-449 dans la spermatogénèse. Dans cette perspective le laboratoire déterminera si cette compensation est présente lors de la multiciliogénèse dans d'autres tissus. Muriel Lizé, chercheuse dans l'équipe du professeur Dobbels est en train de finaliser la mise au point d'une souris invalidée pour miR-449. En collaboration avec notre laboratoire, nous chercherons à tester ces différentes hypothèses. Le laboratoire effectuera aussi une caractérisation complète des cellules multiciliées lorsque miR-449 est invalidé. Nous chercherons notamment à déterminer la présence des cils motiles, leur nombre, leur orientation et des mesures de vitesse de flux seront effectuées. Si aucun impact n'est observé sur les cellules multiciliées, la différenciation sur filtre en Air Liquide nous permettra d'utiliser des antagomirs dirigé contre la famille miR-34, de manière à confirmer un effet compensatoire de miR-34.

Pour finir, une nouvelle étude vient d'identifier un nouveau miARN nommé miR-4423 comme étant nécessaire à la formation des MCC chez l'Homme mais apparemment exprimé uniquement dans les voies respiratoires. De manière surprenante les auteurs indiquent un certain recouvrement entre les cibles de miR-4423 et celle de la famille miR-34/449 expliqué par des similitudes dans la région du « seed » (Perdomo et al., 2013). Ainsi, on pourrait émettre la notion d'un « cilio-seed » qui serait fortement relié à la multiciliogénèse et partagé par plusieurs familles de miARN pour contrôler la biogénèse des cils motiles.

Conclusions

Notre étude a mis en exergue que le processus de différenciation des cellules multiciliées qui survient aussi bien dans des tissus distincts d'un même organisme que chez différents animaux met en jeu des réseaux moléculaires identiques. A cet égard, nos résultats soulignent la pertinence de notre approche expérimentale consistant à comparer systématiquement dans différentes espèces animales évolutivement éloignées les mécanismes aboutissant à une même fonction biologique. A notre sens, c'est à travers un tel procédé que l'on peut mettre à jour et reconstituer des suites d'événements moléculaires communs régissant un fonctionnement biologique important, confirmant, comme le disait à juste titre le biologiste Ukrainien Theodosius Dobzhansky en 1973, que « rien en biologie n'a de sens, si ce n'est à la lumière de l'évolution ».

La découverte des centaines de miARN distincts dans la dernière décennie a créé un nouveau paradigme dans notre compréhension de la régulation des gènes et de la spécification des cellules. Les miARN sont considérés comme des régulateurs majeurs de l'expression génique et sont associés à de nombreux processus physiopathologiques. Sous cet aspect, nos travaux figurent parmi les premiers à démontrer le rôle physiologique d'une famille de miARN dans le contrôle d'une fonction biologique conservée. A travers la mise en évidence des différents mécanismes moléculaires contrôlés par miR-449 pour déclencher la multiciliogenèse, nos résultats soulignent cette propriété singulière de chaque miARN à pouvoir gouverner une seule fonction biologique à travers le contrôle simultané de multiples voies de signalisation.

En fournissant de nouvelles connaissances sur les mécanismes contrôlant la multiciliogenèse, notre étude pourrait également ouvrir la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à traiter les pathologies associées à des défauts de cils vibratiles et fait en ce sens l'objet d'un brevet international du laboratoire {Marcet, 2009 #359}.

Les miARN représentent de nouveaux agents pharmacothérapeutiques émergents dans le traitement de différentes pathologies. Dans cette perspective, notre équipe développe, dans le cadre d'un projet ANR Emergence 2012 (MITHRA) associé à ce dernier brevet, des approches utilisant des modèles murins pathologiques (mucoviscidose, asthme, fibrose pulmonaire) pour explorer l'impact de miR-449 dans le cadre de thérapies pro-régénératrices de l'épithélium respiratoire.

Récemment, une autre équipe a mis au point des polymères cationiques pour la délivrance d'analogues de miARN dans le contexte de la mucoviscidose (McKiernan et al., 2013; Oglesby et al., 2010), confirmant l'impact thérapeutique potentiel des miARN. Dans cette optique, miR-449 constituerait un excellent candidat comme agent pro-régénérateur de l'épithélium respiratoire humain dans certaines pathologies respiratoires.

Annexes



Distinct epithelial gene expression phenotypes in childhood respiratory allergy

Lisa Giovannini-Chami^{*,#}, Brice Marcet^{*}, Chimène Moreilhon^{*,†}, Benoît Chevalier^{*}, Marius I. Illie⁺, Kévin Lebrigand^{*}, Karine Robbe-Sermesant^{*}, Thierry Bourrier[#], Jean-François Michiels[§], Bernard Mari^{*}, Dominique Crénesse[‡], Paul Hofman⁺, Jacques de Blic^{*,#}, Laurent Castillo^{*,#}, Marc Albertini[#] and Pascal Barbry^{*}

ABSTRACT: Epithelial cell contribution to the natural history of childhood allergic respiratory disease remains poorly understood. Our aims were to identify epithelial pathways that are dysregulated in different phenotypes of respiratory allergy.

We established gene expression signatures of nasal brushings from children with dust mite-allergic rhinitis, associated or not associated with controlled or uncontrolled asthma. Supervised learning and unsupervised clustering were used to predict the different subgroups of patients and define altered signalling pathways. These profiles were compared with those of primary cultures of human nasal epithelial cells stimulated with either interleukin (IL)-4, IL-13, interferon (IFN)- α , IFN- β or IFN- γ , or during *in vitro* differentiation.

A supervised method discriminated children with allergic rhinitis from healthy controls (prediction accuracy 91%), based on 61 transcripts, including 21 T-helper cell (Th) type 2-responsive genes. This method was then applied to predict children with controlled or uncontrolled asthma (prediction accuracy 75%), based on 41 transcripts: nine of them, which were down-regulated in uncontrolled asthma, are directly linked to IFN. This group also included *GSDML*, which is genetically associated with asthma.

Our data revealed a Th2-driven epithelial phenotype common to all children with dust mite allergic rhinitis. It highlights the influence of epithelially expressed molecules on the control of asthma, in association with atopy and impaired viral response.

KEYWORDS: Allergic rhinitis, asthma, epithelium, microarrays, paediatric asthma, phenotypes of asthma

Asthma is a heterogeneous and complex disease that frequently co-occurs with allergic rhinitis. Classical pathogenic models characterise asthma and allergic rhinitis as inflammatory diseases associated with an increased T-helper cell (Th) type 2 response. Despite chronic inflammatory processes, several additional defects intrinsic to the airway epithelium may contribute to the pathogenesis. The airway remodelling observed in asthma can appear several years before any clear clinical diagnosis, and even affect preschool asthmatic children [1]. Asthma patients appear more susceptible to infections by respiratory viruses [2]. Epithelial cells derived from asthma patients exhibit a reduced capacity to secrete fibronectin, a well-known contributor to repair in damaged airway epithelium, together with defective antioxidant pathways and tight junctions [3–5].

Some studies have attempted to associate specific gene expression profiles with asthma or allergic rhinitis, mostly in adults [3, 6–10]. Information has also been gathered by genome-wide association studies. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *GSDML* locus (near *ORMDL3*), a protein detected in epithelial tissues, are strongly associated with childhood-onset disease [11]. Based on these findings, our rationale was that defects in the airway epithelium could correspond to primary defects or early secondary events, which could favour chronic inflammation and lead to asthma and/or allergic rhinitis. Thus, we determined the transcriptional signatures of nasal brushings collected from paediatric patients with different clinical phenotypes of dust mite respiratory allergy. Data analysis revealed altered behaviour of several signalling pathways that were further analysed in

AFFILIATIONS

^{*}CNRS and University of Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Sophia Antipolis;

[#]Depts of Pediatric Pulmonology and Allergology;

[†]Pediatric Functional Pulmonology, CHU Nice et Hôpitaux Pédiatriques de Nice CHU-Lenval;

[‡]CHU Nice, Dept of Biological Hematology;

⁺CHU Nice, INSERM and University of Nice Sophia Antipolis, Clinical and Experimental Pathology Laboratory;

[§]CHU Nice, Dept of Otorhinolaryngology;

^{||}CHU Nice, Dept of Anatomopathology, Nice, and

^{||}APHP, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France.

CORRESPONDENCE

P. Barbry
IPMC
CNRS/UNSA UMR 7275
660 route des Lucioles
06560 Sophia Antipolis
France
E-mail: barbry@ipmc.cnrs.fr

Received:

April 26 2011

Accepted after revision:

Sept 15 2011

First published online:

Oct 17 2011

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

This article has supplementary material available from www.erj.ersjournals.com

an *in vitro* model of differentiated human nasal epithelial cells (HNECs).

MATERIALS AND METHODS

Subjects and samples

Patients were aged 6–17 yrs (n=45). 33 were being followed up for a dust mite-allergic rhinitis. 14 were also asthmatic, with either controlled asthma (group “a”; n=7) or uncontrolled asthma (group “A”; n=7). 19 had rhinitis without asthma (group “R”). The control group (group “C”) comprised 12 healthy children. Clinical diagnoses and asthma control staging corresponded to the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma and the paediatric US National Asthma Education and Prevention Program Expert Report 3 criteria (see online supplementary file 1 for details). The project received the approval of the Nice University Hospital Ethics Committee (Nice, France) and all of the volunteers’ parents gave written, informed consent.

Nasal respiratory epithelium sampling was performed by brushing the inferior turbinates.

Viral respiratory tract infection detection by real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using the RealAccurate™ Respiratory Kit according to the manufacturer’s instructions (PathoFinder, Maastricht, the Netherlands). Seven children (one asthmatic, five rhinitis without asthma and one control) positive for respiratory viruses were not included in further analyses. The characteristics of the patients and samples are summarised in table 1 and online supplementary table E1.

Isolation and culture of primary HNECs

Primary cultures of HNECs derived from the nasal mucosa of inferior turbinates were performed as described previously [12]. Each experiment was performed using three different donors.

TABLE 1 Subject characteristics

	Group			
	a	A	R	C
Subjects	7	6	14	11
Dust mite-allergic rhinitis	Yes	Yes	Yes	No
Asthma	Controlled	Uncontrolled	No	No
Age yrs	11.5±3.2	9.1±0.6	11.3±2.8	11.5±3.1
Males/females	2/5	4/2	7/7	7/4
Epithelial cells %	85.8±10.4	86.5±6.5	86.9±8.7	86.9±8.5
PMNs %	6.9±6.1	5±3.2	7.2±7.8	6.8±6.1
Lymphocytes %	7.3±10.7	8.4±6	5.5±7.3	6.3±5.6
FEV₁	97.6±13.2	78.2±7.7*	99±9.4	NA
FEV₁/FVC	89.3±5.7	76.5±3.2*	90.4±5.2	NA
FEF_{25–75%}	103.6±17.9	56.2±9.6*	107.3±18.2	NA

Data are presented as n or mean±sd, unless otherwise stated. Statistical comparisons were performed in allergic (groups a, A and R) versus healthy control subjects (group C) and in uncontrolled (group A) versus controlled (group a) asthmatics using unpaired t-tests and the Chi-squared test. PMN: polymorphonuclear cell; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; FEF_{25–75%}: forced expiratory flow at 25–75% of FVC; NA: not available. *: p<0.005 for group A versus group a by unpaired t-test.

Before treatment with cytokines, HNECs were cultured for 4 weeks at an air–liquid interface to obtain a well-differentiated epithelium [12]. Tested agents (interleukin (IL)-4 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and IL-13 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), 10 ng·mL⁻¹ for 24 h; interferon (IFN)-α/β and IFN-β1a (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1,000 IU·mL⁻¹ for 6 h; and IFN-γ (BD Pharmingen), 100 ng·mL⁻¹ for 6 h) were added on the basolateral side.

Gene expression analyses

Microarray analyses were performed on the GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. Microarray data are archived in the Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) under references GSE19190 and GSE22147, and on the MEDIANTE database developed in our laboratory [13, 14]. The qPCR procedure is detailed in online supplementary file 1, with the primers and probes listed in online supplementary table E2.

Biostatistics

Most statistical calculations and prediction analyses were performed using limma and Random Forest, two packages of the R statistical environment [15]. We used the Functional Annotation Clustering report available from the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [16]. Hierarchical clustering was performed with the MultiExperiment Viewer program, version 4.3 (TM4, Boston, MA, USA), using a Manhattan distance metric and average linkage [17]. Biological networks were built using Ingenuity Pathway Analysis™ software (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA, USA). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to determine whether a set of genes defined *a priori* can characterise differences between two biological states [18, 19]. ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) functional genomics data were used to determine potential binding sites for IFN regulatory factors.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry methods are described in online supplementary file 1.

ELISA assay

The level of MUC5AC released by HNECs in response to IL-13 stimulation was measured using ELISA according to the manufacturer’s instructions (EIAab and USCNLIFE; Wuhan EIAab Science Co. Ltd, Wuhan, China).

RESULTS

Genes differentially expressed in the nasal epithelial cells of children with dust mite allergy

The transcriptional signature of dust mite-allergic rhinitis children (n=27) was compared with that of the healthy children (n=11). We identified 169 differentially expressed transcripts (adjusted p<0.05) (data on request). Among them, 24 transcripts were modulated with an absolute value of log₂(ratio) >1 (table 2). Functional annotation by DAVID is provided in online supplementary table E3. Variation of some genes (*CSTII*, *POSTN*, *NTS*, *CD44*, *GSN* and *ALOX15*) was confirmed by qPCR (online supplementary fig. E1).

Supervised clustering was used to predict a status for each of the 38 patients (allergic or healthy). 35 out of the 38 patients were correctly predicted (prediction accuracy of 91%) (fig. 1a).

TABLE 2 Genes differentially expressed in nasal epithelial brushings from dust mite-allergic rhinitis patients versus healthy subjects (microarray analysis)									
Probe set identifier	mRNA accession number	UniGene identifier	Gene	Gene product	Cytoband	log ₂ (signal)	log ₂ (allergic/healthy)	p-value	
8065412	NM_001898	Hs.123114	CST1	Cystatin SN	20p11.21	9.65	7.15	4.95 × 10 ⁻¹²	
7971077	NM_006475	Hs.136348/ Hs.664318	POSTN	Perlestin, osteoblast-specific factor	13q13.3	7.12	3.56	2.66 × 10 ⁻³	
8083260	NM_001870	Hs.646	CPA3	Carboxypeptidase A3 (mast cell)	3q21-q25	6.17	2.51	5.20 × 10 ⁻⁵	
7921690	NM_017625	Hs.50813	ITLN1	Intelectin 1 (galactouranose binding)	1q22-q23.5	5.83	2.45	3.87 × 10 ⁻²	
8065416	NM_001322	Hs.665305	CST2	Cystatin SA	20p11.21	7.97	1.87	1.06 × 10 ⁻³	
8084657	NM_014375	Hs.81073	FETUB	Fetuin B	3q27	5.78	1.77	3.63 × 10 ⁻³	
8021635	NM_002575	Hs.594481	SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	18q21.3	9.20	1.64	6.97 × 10 ⁻³	
8056222	NM_001935	Hs.368912	DPP4	Dipeptidyl-peptidase 4 (CD26)	2q24.3	6.44	1.56	6.18 × 10 ⁻³	
7921900	NM_053282	Hs.350581	SH2D1B	SH2 domain-containing 1B	1q21	5.91	1.55	3.05 × 10 ⁻⁷	
8036755	NM_001828	Hs.889	CLC	Charcot-Leyden crystal protein	19q13.1	4.57	1.50	2.73 × 10 ⁻²	
7984001	NM_004751	Hs.194710	GCNT3	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	15q21.3	8.73	1.39	8.15 × 10 ⁻⁵	
8063761	NM_177980	Hs.54973	CDH26	Cadherin-like 26	20q13.2-q13.33	8.67	1.38	6.84 × 10 ⁻³	
8089568	NM_138806	Hs.305158	CD200R1	CD200 receptor 1	3q13.2	8.90	1.35	3.90 × 10 ⁻⁵	
8112668	NM_016591	Hs.272404	GCNT4	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2	5q12	5.85	1.29	4.05 × 10 ⁻²	
8070567	NM_003226	Hs.82361	TFF3	(β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase) Treffal factor 3 (intestinal)	21q22.3	9.86	1.26	2.11 × 10 ⁻²	
7942135	NM_018043	Hs.503074	TMEM16A	Transmembrane protein 16A	11q13.3	7.41	1.23	6.48 × 10 ⁻³	
8154233	NM_014143	Hs.521989	CD274	CD274 molecule	9p24	6.75	1.23	3.84 × 10 ⁻⁵	
7957458	NM_006183	Hs.80962	NTS	Neurotensin	12q21	9.14	1.16	4.79 × 10 ⁻²	
8023688	NM_002974	Hs.123035	SERPINB4	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	18q21.3	8.67	1.15	3.40 × 10 ⁻³	
8147132	NM_000067	Hs.155097	CA2	Carbonic anhydrase II	8q22	6.44	1.14	3.87 × 10 ⁻²	
7909946	GENSCA- N0000026059	NA	NA	NA	NA	6.01	1.14	1.05 × 10 ⁻²	
8156134	NM_006180	Hs.494312/ Hs.653428	NTK2	Neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2	9q22.1	5.63	1.10	5.93 × 10 ⁻³	
8102050	NM_178833	Hs.546482	NHEDC2	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain-containing 2	4q24	6.02	1.02	6.84 × 10 ⁻³	
8089851	NM_000187	Hs.368254	HGD	Homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase)	3q13.33	5.71	-1.22	2.50 × 10 ⁻²	

Genes were ranked according to decreasing log₂(allergic/healthy). Only genes with a log₂(ratio) >1 and a significant p-value (p<0.05) after a Benjamini-Hochberg correction for multiple tests were selected. Bold indicates genes induced *in vitro* with a value of log₂(ratio) >1 by both interleukin (IL)-4 and IL-13 in human nasal epithelial cells. A more detailed table is provided as online supplementary table E3. NA: not available.

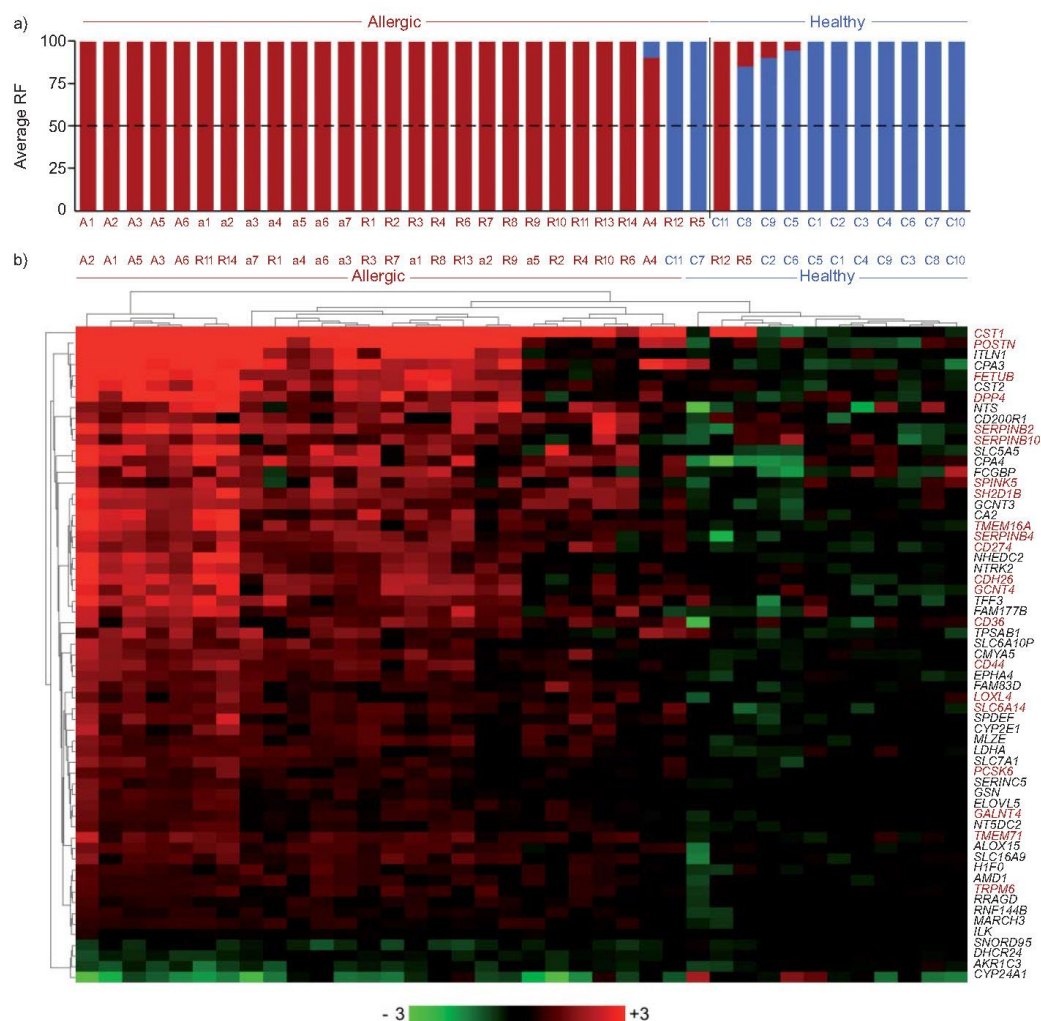


FIGURE 1. Discrimination by Random Forest (RF) of children with dust mite allergic rhinitis from healthy children and heat-map representation of the 61 most discriminant genes. a) Histogram showing, for each patient, the percentage of classification as a dust mite-allergic rhinitis (red) or healthy (blue) child. b) Nonsupervised, hierarchical clustering of the same patients using the set of 61 genes common to all Random Forest classifiers (see details in the Materials and methods section). Each square represents the expression level of a given gene in a given sample relative to the average expression level in controls. A red to green colour scale indicates gene expression levels above (red) or below (green) the average level of expression in healthy subjects for the same transcript. Clustering was performed using an average linkage method, using a Manhattan distance. The red colour on gene names (right) indicates genes induced *in vitro* by interleukin (IL)-4 and IL-13.

Specificity and sensitivity are summarised in a receiver operating characteristic (ROC) curve in online supplementary figure E2A, showing an area under the ROC curve of 0.88. The Random Forest approach that was used allowed the identification of the most influential genes for the prediction, leading to a set of 61 transcripts that was common to 20 independent cross-validations. Most genes were up-regulated in the allergic conditions (fig. 1b). 16 of

them had previously been linked to asthma or allergic rhinitis by gene expression profiling (online supplementary table E4) [3, 6–10]. The signature was linked to allergic status but independent of asthma status. Indeed, supervised clustering was unable to discriminate the 13 asthmatic patients from the 14 allergic rhinitis patients without asthma. No differential expression was detected between these two groups of patients (data not shown).

Epithelial Th2 signature discriminates allergic children from healthy controls

We observed that several transcripts dysregulated in patients allergic to dust mites were also linked in the literature to IL-4 or IL-13 [20]. We mimicked this situation *in vitro* by stimulation of primary HNECs with IL-4 or IL-13. With this model, we confirmed that IL-13 stimulation increased the expression (online supplementary fig. E3A) and secretion of MUC5AC, a goblet cell marker (online supplementary fig. E3B). We also observed, in parallel, the decreased expression of FoxJ1, a ciliated cell marker (online supplementary fig. E3A). 46 airway epithelial transcripts were selected, based on their high response to Th2 cytokines and their detection in highly differentiated airway epithelial cells (online supplementary table E5). 21 transcripts of this "Th2 signature" were among the 61 transcripts predicting allergic or healthy children (fig. 1). The importance of Th2 regulation was assessed by a normalised enrichment score >1 (1.61, with nominal p-value and false discovery rate q-value of <0.001), as determined by GSEA [18, 19]. Interestingly, we noticed that the transcripts associated with the Th2 signature displayed a larger $\log_2(\text{ratio})$ in uncontrolled (group A) than in controlled (group a) asthma (fig. 1). This led us to investigate the existence of a specific expression profile associated with uncontrolled asthma.

Control of asthma affects gene expression signature of nasal epithelial cells

The next analysis compared the two groups of subjects with uncontrolled or controlled asthma. Table 1 describes the characteristics of these patients. The expression of 160 genes differed significantly between the two groups (online supplementary table E6). Functional annotation is reported in online supplementary table E7. The Random Forest approach correctly predicted the class for 12 out of 14 samples, with a 75.4% prediction accuracy (fig. 2a). Specificity and sensitivity are summarised in a ROC curve in online supplementary figure E2B, showing an area under the ROC curve of 0.833. It also identified a minimal set of the 41 most influential genes for the prediction (fig. 2b). Up-regulation of *POSTN*, *FETUB* or *DPP4* (also belonging to Th2 signature) (online supplementary table E5) in the uncontrolled group is coherent with the larger $\log_2(\text{ratio})$ observed for Th2 responding transcripts in figures 1 and 2. We also noticed a down-regulation of several IFN-stimulated genes (ISGs), such as *CXCL10*, *MX2*, *IFIT2*, *DUOX2*, *GBP2* and *GBP5*, among a larger cluster of down-regulated genes (fig. 2). This was illustrated by Ingenuity Pathways Analyses (online supplementary fig. E4). Our cluster of down-regulated genes also included *GSDML*, a gene located in a region of chromosome 17q21, which has recently been linked to juvenile asthma in several genome-wide association studies [11]. The differential expression of *CXCL10*, *MX2*, *IFIT2*, *DUOX2* and *GSDML* was confirmed by qPCR (online supplementary fig. E1). *GSDML* and *DUOX2* proteins were immunodetected by histochemistry in nasal and bronchial airway epithelia (fig. 3).

IFN response analysis in patients and cultured HNECs

IFN regulation was explored *in vitro* by stimulating primary HNECs with IFN- α , IFN- β or IFN- γ . We selected IFN-responsive transcripts (online supplementary table E8). The GSEA approach revealed significant normalised enrichment scores for all subtypes of IFNs in the uncontrolled/controlled asthma comparison (1.7 for IFN- α , 1.64 for IFN- β and 1.56 for IFN- γ). The

capacity of IFNs to induce the expression of *MX1*, *ST8SIA4* and *GSDML* was confirmed by qPCR on primary cultures of HNECs. A peak of *GSDML* induction was observed after 12 h of IFN- α stimulation, while the peak of induction for *MX1* and *ST8SIA4* was reached at 6 h (fig. 4a). A survey of the genomic context for *MX2*, *IFIT2*, *CXCL10*, *GSDML*, *ST8SIA4* and *DUOX2* revealed the presence of several consensus binding sequences for IFN regulatory factors (full data on request) (online supplementary fig. E5). Altogether, these observations suggest a direct regulation of these different genes by IFN. Importantly, the transcript levels of IFN- β , IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2/3$, IFN- $\alpha 1$ and IFN- $\alpha 2$ were decreased in uncontrolled asthmatics compared with either controlled asthmatics or healthy subjects (fig. 4b). Endogenous production of epithelial IFNs, rather than defective IFN signalling pathways, is therefore probably involved in these processes.

Airway epithelial regeneration and severity of allergic diseases

Impaired capacity of repair of the airway epithelium is a hallmark of allergic airway diseases [5]. We have recently established gene expression signatures during *in vitro* HNEC regeneration and differentiation [12]. The "terminal differentiation" signature was used to enrich the annotation derived from the expression profiles obtained with Th2 cytokines and IFN experiments. As expected, the classification of the patients was principally linked to the effects of Th2 cytokines and IFNs. However, several transcripts associated with the disease were also linked to the terminal differentiation signature (online supplementary table E9). A first group of genes, including *PLK4*, *CDC20B*, *GSDML* and *CYFIP2*, was clearly induced during differentiation while being down-regulated in patients with uncontrolled asthma. This group puts together important markers of multiciliogenesis (*PLK4* and *CDC20B*) [12] and molecules associated with asthma in genome-wide analyses (*GSDML* and *CYFIP2*). A second group, which includes *POSTN*, *SPINK5*, *CD44*, *TFE3*, *ITLN1*, *FOXA3* and *SPDEF*, was clearly associated with basal or mucous cells [21]. Most of them were decreased during *in vitro* differentiation while all were up-regulated in patients with uncontrolled asthma.

DISCUSSION

The airway epithelium is a complex physical barrier, playing an intrinsic role in innate and adaptive immunity, through the production of numerous cytokines and chemokines. Our work highlights the importance of IFN- and Th2-driven epithelial responses in the pathogenesis of allergic respiratory diseases. Our findings were based on biostatistical approaches, such as Random Forest, Ingenuity and GSEA, which take into account not only the number of patients, but also the size of gene clusters that can be regulated by these cytokines. Importantly, these approaches increase the statistical significance of our observations.

The choice to perform our investigations on upper, rather than on lower, airway epithelium was motivated by its noninvasive sampling, which is easily applicable in young children. It allows the recruitment of true controls exempt of pulmonary disease, a situation which is clearly not possible in studies using bronchoscopic sampling [1]. It also allows investigation of patients with severe or uncontrolled asthma phenotypes without stopping their long-term inhaled corticosteroid treatment for asthma, as nasal deposition can be considered as negligible with the devices used in this study [22]. Interestingly, we observed a good overlap

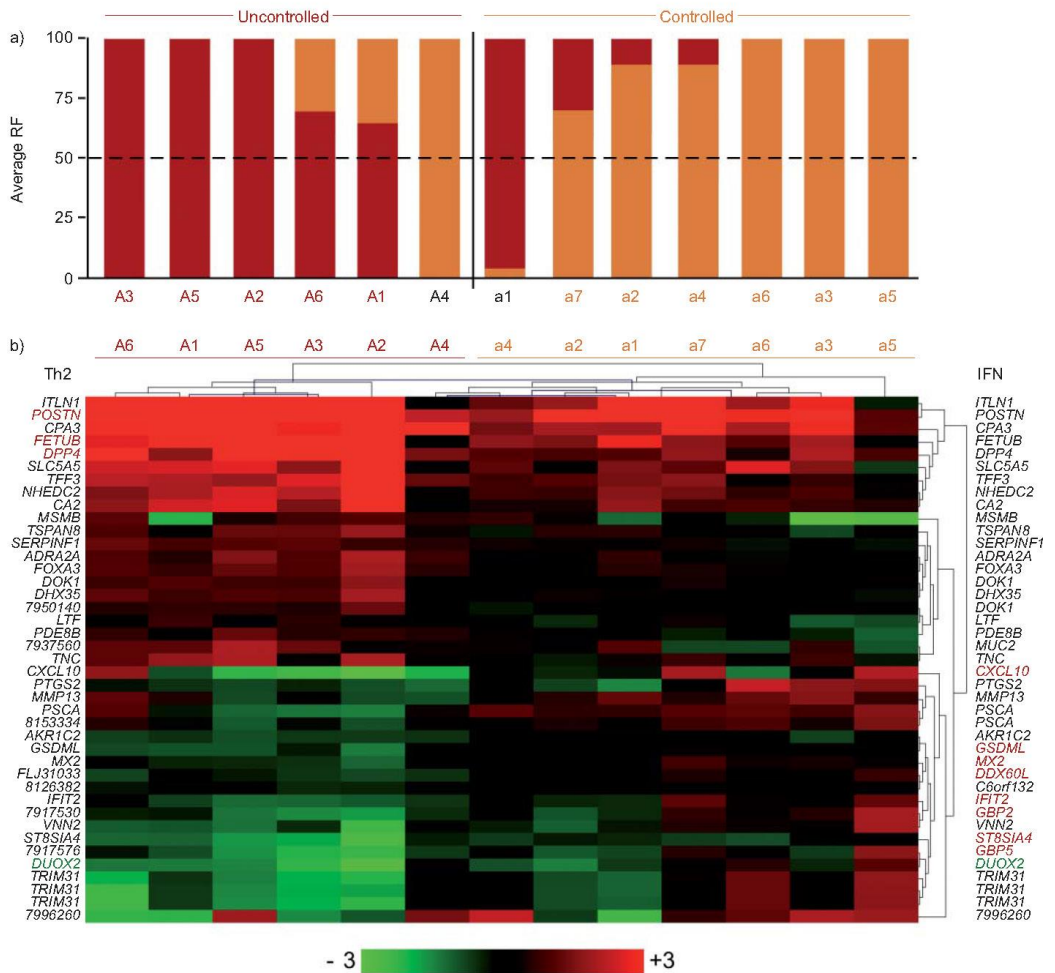


FIGURE 2. Discrimination by Random Forest (RF) of children with uncontrolled *versus* controlled asthma and heat-map representation of the 41 most discriminant genes. a) Histogram showing, for each patient, the percentage of classification as uncontrolled asthma (red) and controlled asthma (orange). b) Nonsupervised, hierarchical clustering of the same patients using the 41 probes common to all Random Forest classifiers (see Materials and methods section for details). Each square represents the expression level of a given gene in a given sample. A red to green colour scale indicates gene expression levels above (red) or below (green) the average level of the healthy controls for the same transcript. Clustering was performed using an average linkage method, using a Manhattan distance. Red-coloured gene names indicate transcripts induced by interleukin (IL)-4 and IL-13 (left) or by interferons (IFNs) (right) (corresponding to a $\log_2(\text{ratio}) > 1$ in human nasal epithelial cells (HNECs)). Gene names coloured in green indicate transcripts down-regulated by IL-4 and IL-13 (left) ($\log_2(\text{ratio}) > 1$ in HNECs).

between our “nasal epithelial” gene lists and several gene expression profiles in bronchial epithelium, notwithstanding differences between nasal and bronchial epithelial cells [23, 24], such as the near absence of remodelling in the nasal epithelium [25]. In this context, the use of alternative techniques to harvest lower airway cells during general anaesthesia could be worth investigating [26]. Our inability to identify *ad hoc* biomarkers for discriminating asthmatic and rhinitis patients could be due to the

choice of sampling material. If this is true, a comprehensive comparison of bronchial and nasal epithelial cells from the same patients would help explore this issue. This was unfortunately not planned in the present study. The relatively small size of the study (45 samples) could also be limiting. A third explanation could be that the major differences discriminating asthma from allergic rhinitis would, rather, depend on other cell types (dendritic or mesenchymal cells, *etc.*). From that perspective,

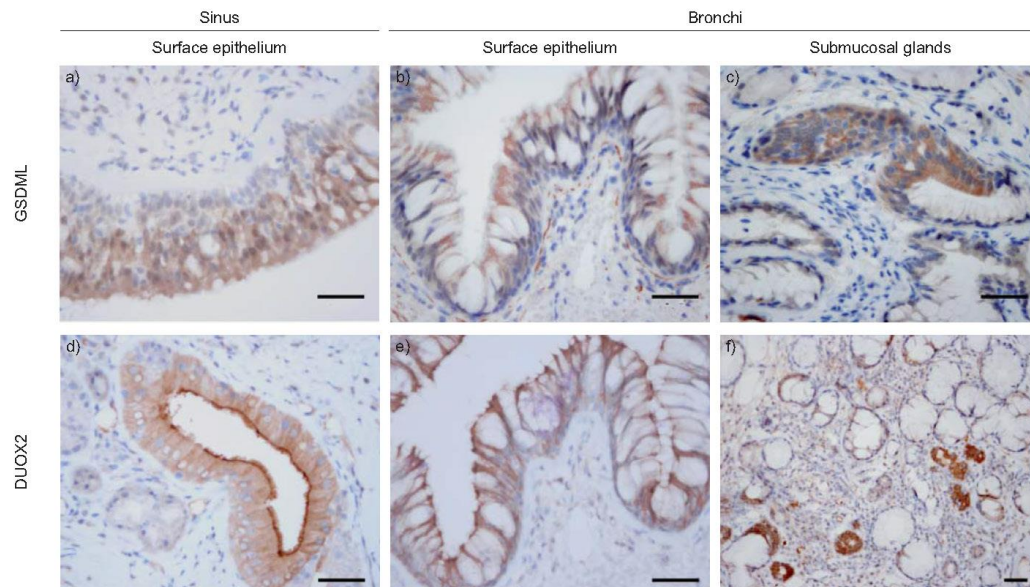


FIGURE 3. Immunohistochemical staining of sinus and bronchial biopsies. Representative immunostaining of a–c) GSDML and d–f) DUOX2 in surface epithelium and submucosal glands for healthy adults are shown. Positive immunostaining was observed for the two proteins in sinus and bronchial sections. Strong signals were also detected in submucosal glands for the different markers. Scale bars=100 μ m.

progression from allergic rhinitis to asthma could not be detected in the epithelium *per se*.

Our study establishes epithelial activation by Th2 cytokines as a central trait of airway allergic respiratory disease. This is in line with the observation that IL-13 can recapitulate most of the characteristics of asthma in several experimental models of the disease [27]. Our clinical and *in vitro* results clearly demonstrate the major impact of Th2 cytokines on allergic subjects, reflecting the strength of the atopic status. Several Th2-induced genes, such as *POSTN*, *ITLN1*, *ALOX15*, *CD44* and *SERPINB4*, have previously been linked to asthma. Others could represent additional relevant biomarkers, due to their large and consistent variations in the allergic group. For example, *CST1*, which encodes a cysteine protease inhibitor, is already associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis patients [28]. Another example is *NTS*, which has been implicated in wound healing in chronic colitis [29].

An enhanced up-regulation of Th2-responsive genes (characterised by larger $\log_2(\text{ratio})$ values) was observed in uncontrolled asthma. In fact, asthma severity in children has already been associated with atopy in epidemiological studies [30]. This association seems specific for childhood asthma, as an inverse relationship has been reported in adults [31]. Interestingly, IL-13 has been shown to induce a profibrotic bronchial phenotype *via* a continuous secretion of transforming growth factor- β 2 [32]. Strikingly, the first gene ontology theme in the comparison between uncontrolled and controlled asthma corresponds to the term “structural constituents of extracellular matrix”, with enhanced expression of *POSTN*, *TNC*, *FBN2*, *FBLN2*, *FMOD*

and *COL4A6*. It is tempting to speculate that this dysregulation could be directly related to the structural modifications and remodelling of the epithelium particularly observed in severe asthma [33]. At the same time, *POSTN* has been reported to induce re-entry of differentiated mammalian cardiomyocytes into the cell cycle, in connection with tissue repair [34]. Mucus hypersecretion and goblet cell metaplasia are important traits of asthma, also linked with IL-13 dysregulation. We also noticed that *TEF3*, which is expressed in mucous cells and can promote the differentiation of ciliated human airway epithelial cells [21], was up-regulated in allergic patients. This illustrates the complexity of the mechanisms leading to abnormal repair and remodelling.

The major impact of Th2 cytokines probably masks weaker, intrinsic epithelial features. We believe that this represents a confounding factor when analysing epithelial susceptibility with the microarray technique. In order to dampen the impact of the Th2 response, we have compared subgroups of patients with uncontrolled or controlled asthma.

Another observation of our study is the existence of an altered IFN response in the nasal epithelium of uncontrolled asthmatic patients; this trait may be more directly related to an intrinsic epithelial susceptibility. The IFN response was reduced in the uncontrolled asthma group relative to the controlled asthma and healthy groups. We excluded the possibility that these effects were caused by viral infections: 1) a viral PCR assay, able to detect 90% of respiratory tract viral infections, eliminated cases of viral infection; and 2) a careful evaluation of CXCL10 transcript levels in “uninfected” patients identified additional infected samples.

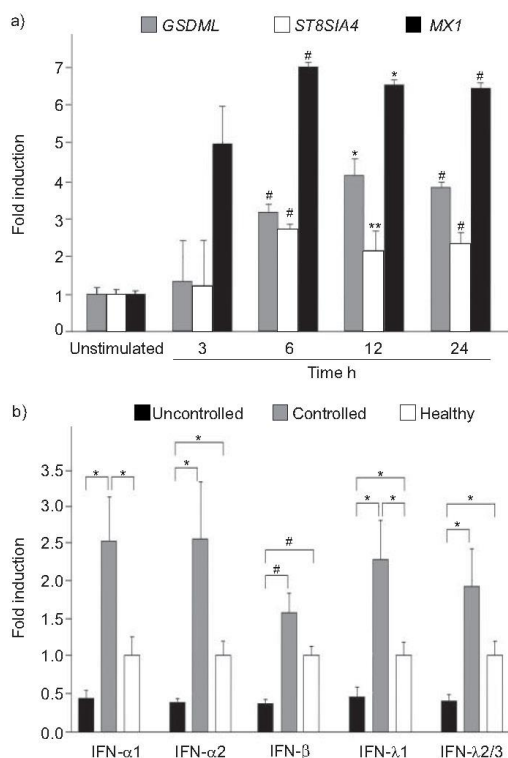


FIGURE 4. Characterisation of the interferon (IFN) response. a) Measurement by real-time quantitative PCR (qPCR) of the induction of *GSDML*, *ST8SIA4* and *MX1* by IFN- α in human nasal epithelial cells (HNECs). Levels of *GSDML*, *ST8SIA4* and *MX1* were assessed in differentiated HNECs 3, 6, 12 and 24 h after stimulation with IFN- α . Measurements were performed using SYBR Green. Results are expressed as fold-change relative to the unstimulated HNECs. b) Measurement of IFNs by qPCR in patients. Levels of IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- β , IFN- λ 1 and IFN- λ 2/3 transcripts in patients with uncontrolled asthma, patients with controlled asthma and healthy controls. Data are expressed relative to an average of 11 healthy controls. Measurements were performed using Taqman probes. Results are expressed as fold-change relative to the healthy control group. Data are presented as mean \pm SEM. #: $p < 0.005$ by unpaired t-test; *: $p < 0.05$ by unpaired t-test; **: $p < 0.01$ by unpaired t-test.

ISGs that are decreased in patients with uncontrolled asthma represent a quarter of the genes identified by our second supervised analysis. Unexpectedly, we identified *GSDML* in that cluster. Our study reports several additional observations suggesting a direct association of this gene with the abnormalities affecting the paediatric asthmatic epithelium: first, the existence of several response elements for IFN regulatory factors in its promoter region; secondly, its transcriptional induction by epithelial IFN in HNECs; and thirdly, its protein expression in airway epithelial cells. This is in line with the fact that one of its SNPs (rs7216389) has been associated with early onset of asthma,

acute severe exacerbations (80% of which are virus-induced in children) and asthma severity [11, 35, 36]. MOFFATT *et al.* [37] initially noted an association of childhood asthma risk with modified expression of *ORDML3*, located in the immediate vicinity of *GSDML*. The identification of a variant in a splice site for *GSDML* in strong linkage disequilibrium with *ORDML3* has recently suggested that *GSDML* would be the causative gene associated with asthma [38].

Decreased levels of IFN- α , IFN- β , IFN- λ 1 and IFN- λ 2/3 paralleled the down-regulation of IFN-stimulated genes observed in patients with uncontrolled asthma. This confirms and extends findings by DE BLIC *et al.* [39] showing a correlation between asthma symptoms and the IFN response in a cohort of 28 children with difficult-to-treat asthma. In their study, lower levels of IFN- γ were associated with persistent symptoms [39]. Deficient epithelial cell IFN- β and IFN- λ production during rhinovirus-induced asthma exacerbations was associated with increased viral load, defective apoptosis and cell death bias [2]. Epidemiological studies have associated the onset of asthma with reduced IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells at 9 months of age, while a normalisation of IFN- γ production was observed in children showing a resolution of asthma symptoms [40, 41].

Regardless of the exact molecular mechanisms leading to impaired IFN production, from our results, one could anticipate some benefits of IFN treatments in patients with uncontrolled asthma, as suggested by recent *in vitro* experiments with IFN- β [42]. As the association between defective epithelial cell IFN pathways and the lack of asthma control in patients could be specific to paediatric asthma, careful evaluation of therapeutic options based on the development of innate immunity would require the organisation of clinical trials addressing this specific issue in a paediatric population. Finally, our work illustrates some specificities of severe paediatric asthma, which not only results from the development of T-cell-mediated biased adaptive responses, but also from an inefficient epithelial innate immunity.

SUPPORT STATEMENT

Research support was provided by CNRS, CHU de Nice, the association Vaincre la Mucoviscidose, ADPHUN, ANR-09-GENO-039, FRM and SP2A (by a grant from Astra Zeneca to SP2A).

CLINICAL TRIAL

This study is registered as www.clinicaltrials.gov with identifier number NCT00569361.

STATEMENT OF INTEREST

A statement of interest for the study itself can be found at www.erj.ersjournals.com/site/misc/statements.xhtml

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the technological expertise of the Nice Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform (Nice, France). The authors also thank, for their excellent technical assistance, S. Farion (CHU Nice, Service d'Anatomopathologie, Hôpital l'Archet 2, Nice) for cytological analysis, N. Treillet and V. Foussard (both CHU Nice, Service d'Explorations Fonctionnelles Pédiatriques, Hôpitaux Pédiatriques de Nice CHU-LENVAL, Nice) for spirometry measurements, and F. Aguila (CNRS and University of Nice Sophia-Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097, Sophia Antipolis, France) for assisting in the preparation of figures.

REFERENCES

- Saglani S, Payne DN, Zhu J, *et al.* Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 858–864.
- Johnston SL. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 267–270.
- Kicic A, Hallstrand TS, Sutanto EN, *et al.* Decreased fibronectin production significantly contributes to dysregulated repair of asthmatic epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 889–898.
- Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, *et al.* Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 179–185.
- Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1233–1244.
- Lilly CM, Tateno H, Oguma T, *et al.* Effects of allergen challenge on airway epithelial cell gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 579–586.
- Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, *et al.* Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15858–15863.
- Laprise C, Sladek R, Ponton A, *et al.* Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics* 2004; 5: 21.
- Guajardo JR, Schleifer KW, Daines MO, *et al.* Altered gene expression profiles in nasal respiratory epithelium reflect stable *versus* acute childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 243–251.
- Benson M, Jansson L, Adner M, *et al.* Gene profiling reveals decreased expression of uteroglobin and other anti-inflammatory genes in nasal fluid cells from patients with intermittent allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 473–478.
- Moffatt ME, Gut IG, Demenais F, *et al.* A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010; 363: 1211–1221.
- Marcel B, Chevalier B, Luxardi G, *et al.* Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 693–699.
- Le Brigand K, Barbry P. Mediant: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* 2007; 23: 1304–1306.
- Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C, *et al.* An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e87.
- Gentleman R, Carey V, Bates D, *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 2004; 5: R80.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protocols* 2008; 4: 44–57.
- Saeed AI, Sharov V, White J, *et al.* TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34: 374–378.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15545–15550.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34: 267–273.
- Choy DF, Modrek B, Abbas AR, *et al.* Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol* 2011; 186: 1861–1869.
- LeSimple P, van Seuningen I, Buisine M-P, *et al.* Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 296–303.
- Glover W, Chan HK, Eberl S, *et al.* Effect of particle size of dry powder mannitol on the lung deposition in healthy volunteers. *Int J Pharm* 2008; 349: 314–322.
- McDougall CM, Blaylock MG, Douglas JG, *et al.* Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 560–568.
- Lopez-Souza N, Favoreto S, Wong H, *et al.* *In vitro* susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1384–1390.
- Bousquet J, Jacot W, Vignola AM, *et al.* Allergic rhinitis: a disease remodeling the upper airways? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 43–49.
- Doherty GM, Christie SN, Skibinski G, *et al.* Non-bronchoscopic sampling and culture of bronchial epithelial cells in children. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1221–1225.
- Grunig G, Warnock M, Wakil AE, *et al.* Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998; 282: 2261–2263.
- Fietta AM, Bardoni AM, Salvini R, *et al.* Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R160.
- Zhao D, Pothoulakis C. Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation. *Peptides* 2006; 27: 2434–2444.
- Fitzpatrick AM, Gaston BM, Erzurum SC, *et al.* Features of severe asthma in school-age children: atopy and increased exhaled nitric oxide. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1218–1225.
- Moore WC, Bleeker ER, Curran-Everett D, *et al.* Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 405–413.
- Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL, *et al.* The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 385–391.
- Cohen L, E X, Tarsi J, *et al.* Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 138–145.
- Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, *et al.* Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 2007; 13: 962–969.
- Smit LA, Bouzigon E, Pin I, *et al.* 17q21 variants modify the association between early respiratory infections and asthma. *Eur Respir J* 2010; 36: 57–64.
- Halapi E, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, *et al.* A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 902–908.
- Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, *et al.* Genetic variants regulating *ORMDL3* expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 2007; 448: 470–473.
- A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2011; 467: 1061–1073.
- de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, *et al.* Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 94–100.
- Smart JM, Horak E, Kemp AS, *et al.* Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN- γ responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 450–456.
- Stern DA, Guerra S, Halonen M, *et al.* Low IFN- γ production in the first year of life as a predictor of wheeze during childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 835–841.
- Cakebread JA, Xu Y, Grainge C, *et al.* Exogenous IFN- β has antiviral and anti-inflammatory properties in primary bronchial epithelial cells from asthmatic subjects exposed to rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1148–1154.

Identification of Keratinocyte Growth Factor as a Target of microRNA-155 in Lung Fibroblasts: Implication in Epithelial-Mesenchymal Interactions

Nicolas Pottier^{1,2,3,✉}, Thomas Maurin^{1,2,✉}, Benoit Chevalier^{1,2}, Marie-Pierre Puisségur^{1,2,ab}, Kevin Lebrigand^{1,2}, Karine Robbe-Sermesant^{1,2}, Thomas Bertero^{1,2}, Christian L. Lino Cardenas³, Elisabeth Courcot³, Géraldine Rios^{1,2}, Sandra Fourre^{1,2}, Jean-Marc Lo-Guidice³, Brice Marcet^{1,2}, Bruno Cardinaud^{1,2}, Pascal Barbry^{1,2,*}, Bernard Mari^{1,2,*}

1 CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097, Sophia Antipolis, France, **2** University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France, **3** EA2679, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Lille, France

Abstract

Background: Epithelial-mesenchymal interactions are critical in regulating many aspects of vertebrate embryo development, and for the maintenance of homeostatic equilibrium in adult tissues. The interactions between epithelium and mesenchyme are believed to be mediated by paracrine signals such as cytokines and extracellular matrix components secreted from fibroblasts that affect adjacent epithelia. In this study, we sought to identify the repertoire of microRNAs (miRNAs) in normal lung human fibroblasts and their potential regulation by the cytokines TNF- α , IL-1 β and TGF- β .

Methodology/Principal Findings: MiR-155 was significantly induced by inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β while it was down-regulated by TGF- β . Ectopic expression of miR-155 in human fibroblasts induced modulation of a large set of genes related to "cell to cell signalling", "cell morphology" and "cellular movement". This was consistent with an induction of caspase-3 activity and with an increase in cell migration in fibroblasts transfected with miR-155. Using different miRNA bioinformatic target prediction tools, we found a specific enrichment for miR-155 predicted targets among the population of down-regulated transcripts. Among fibroblast-selective targets, one interesting hit was keratinocyte growth factor (KGF, FGF-7), a member of the fibroblast growth factor (FGF) family, which owns two potential binding sites for miR-155 in its 3'-UTR. Luciferase assays experimentally validated that miR-155 can efficiently target KGF 3'-UTR. Site-directed mutagenesis revealed that only one out of the 2 potential sites was truly functional. Functional *in vitro* assays experimentally validated that miR-155 can efficiently target KGF 3'-UTR. Furthermore, *in vivo* experiments using a mouse model of lung fibrosis showed that miR-155 expression level was correlated with the degree of lung fibrosis.

Conclusions/Significance: Our results strongly suggest a physiological function of miR-155 in lung fibroblasts. Altogether, this study implicates this miRNA in the regulation by mesenchymal cells of surrounding lung epithelium, making it a potential key player during tissue injury.

Citation: Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puisségur M-P, Lebrigand K, et al. (2009) Identification of Keratinocyte Growth Factor as a Target of microRNA-155 in Lung Fibroblasts: Implication in Epithelial-Mesenchymal Interactions. PLoS ONE 4(8): e6718. doi:10.1371/journal.pone.0006718

Editor: Dong-Yan Jin, University of Hong Kong, Hong Kong

Received: April 17, 2009; **Accepted:** July 7, 2009; **Published:** August 24, 2009

Copyright: © 2009 Pottier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Cancéropole PACA, the INCa (PL0079), the European Community (MICROENVIMET, FP7-HEALTH-F2-2008-201279), "Vaincre la Mucoviscidose" and the "Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI)". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: direction@ipmc.cnrs.fr (PB); mari@unice.fr (BM)

^{ab} Current address: Taub Institute, Columbia University, New York, New York, United States of America

^{1b} Current address: Institut National de Santé et de Recherche Médicale, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France

✉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Epithelial-mesenchymal interactions are critical in regulating many aspects of vertebrate embryo development and for the maintenance of homeostatic equilibrium in adult tissues [1]. Stromal cells maintain control over epithelial cell proliferation, survival and response to wounds and could also play a collaborative role in pathological conditions such as cancer [2]. The interactions between epithelium and mesenchyme are

believed to be mediated by paracrine signals and extracellular matrix (ECM) components secreted from fibroblasts thereby affecting adjacent epithelia. In response to paracrine signals such as cytokines and direct-cell contact from adjacent tumor epithelial cells, fibroblasts undergo changes that may alter the normal epithelial-mesenchymal interactions [3–5].

This is in particular the case during pulmonary fibrosis, where it has been demonstrated that a variety of cytokines such as transforming growth factor-beta (TGF- β), tumor necrosis factor-

alpha (TNF- α), fibroblast growth factors (FGFs), interleukin-1 (IL-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) are produced at the sites of active fibrosis. These cytokines appear to be mostly expressed by activated inflammatory cells, such as macrophages and eosinophils [6]. A balance of pro-fibrogenic and anti-fibrogenic forces generated by these networks of cytokines determines the outcome of lung injury and inflammation. *In vitro* studies of individual cytokines on fibroblasts has revealed a variety of roles for these cytokines in the regulation of the fibrotic process, such as mitogenic activity, stimulation of extracellular matrix and alpha-smooth muscle actin gene expression, alteration of the contractile phenotype, production of proteases, protease inhibitors, chemokines, cytokines and growth factors [7].

Recently, microRNAs (miRNAs) have emerged as a major class of gene expression regulators linked to many biological functions. Since the first miRNA was identified in *Caenorhabditis elegans* as an important factor for timing of larval development [8,9], thousands of miRNAs have been characterized including about 700 miRNAs in the human genome [10]. MiRNAs are derived from a primary transcript called pri-miRNAs. The current model of maturation includes primary nuclear cleavage of pri-miRNAs by the RNase III endonuclease Drosha, which liberates pre-miRNA hairpins. Hairpins are exported from the nucleus to the cytoplasm, where they are cleaved by Dicer, another RNase III endonuclease [11–13]. Dicer generates short RNA sequences of about 22-nucleotides. MiRNAs are then assembled with proteins of the Argonaute family into a ribonucleoprotein complex: miRNP [14], which exhibits binding complementarities with sequences usually located in the 3'UTR of the target transcript. The formation of a complex between miRNP and a target leads to a repression of protein synthesis, often associated with mRNA degradation [15]. Complex formation follows a set of rules that have been substantiated by experimental evidences [16–18]. The major determinant of the interaction between the miRNA and its targets corresponds to a short stretch of 6–8 nucleotides located 5' of the miRNA, called the "seed". This implies that one miRNA can theoretically interact with hundreds of mRNAs [19]. Because several miRNAs can also target the same transcript, the miRNA regulatory network appears amazingly complex. To date, a small proportion of miRNA targets have been validated and the exact function of most miRNAs remains to be elucidated.

Dysregulation of these molecules, including miR-155 [20], has been recently identified in the pathogenesis of inflammatory diseases [20]. MiR-155 is contained within the only phylogenetically conserved region of BIC RNA [21,22]. It has been linked to cancer [23–26], viral infection [27] and immunity [28–31]. MiR-155 has been shown to be induced by proinflammatory stimuli such as lipopolysaccharides (LPS), Toll-like receptors (TLRs), IL-1 and TNF- α in macrophages and dendritic cells [32–34]. It has also been detected in synovial fibroblasts and rheumatoid synovial tissue [35]. Multiple targets for miR-155 have been identified in several cell types and linked with the regulation of B and T cell differentiation [29,30,36–38], TLR signalling in inflammatory cells [34], or cellular adhesion in epithelial malignancies [39]. To date, the putative function of miR-155 in fibroblasts remains poorly documented [35,40].

The aim of the present study was to identify the repertoire of miRNA expressed in fibroblasts and to characterize their potential regulation by inflammatory cytokines. The detection of miR-155 into these cells led us to investigate its relationship with keratinocyte growth factor (KGF, FGF7), a central factor in tissue repair that we are establishing as a direct target of miR-155.

Results

miRNA expressed in normal lung fibroblast cells and their modulation by inflammatory cytokines

We first analyzed the miRNA expression profile of normal human pulmonary fibroblasts (HFL1, CCL-153) and compared it with the miRNome of the alveolar epithelial cell line A549. Large differences distinguish the 2 cell lines, such as a high expression of the oncogenic miR-21 in the epithelial tumor cells or the restricted expression of miR-199a, miR-143, miR-145 and miR-155 to fibroblasts (Fig. 1A and Table S1). The detection of miR-155, a major effector of B and T cells into fibroblasts confirm previous studies indicating that this miRNA can be also detected in non haematological tissues [40,41]. Because miR-155 has been previously shown to be upregulated by inflammatory cytokines in macrophages [32], we then analyzed the potential regulation of miR-155 by inflammatory cytokines. Results indicate that miR-155 was slightly induced by TNF- α and IL-1 β while its level decreased following TGF- β stimulation (Fig. 1B). Interestingly, several other miRNAs, such as miR-29a/b, miR-30a, miR-125a/b and miR-199 varied in a similar manner following stimulation, with a milder effect of IL-1 β relative to TNF- α (Fig. 1B). Levels of mature miR-155 following treatment with the three cytokines were determined by quantitative RT-PCR (Fig. 1C). Cells were serum starved 2 hours before treatment and subsequently stimulated either for 4 h or 24 h. After 4 h of TNF- α and IL-1 β stimulation, the level of miR-155 displayed a slight increase while it decreased in presence of TGF- β (Fig. 1C). A longer treatment led to a more pronounced effect of TNF- α and TGF- β while the level of miR-155 returned to its basal level in presence of IL1 β . Of note, no significant modulation of miR-155 could be observed in A549 cells (data not shown).

MiR-155 expression in a mouse model of lung fibrosis

We then investigated the expression of miR-155 in a mouse model of lung fibrosis, using the well-established bleomycin instillation model. MiR-155 expression was measured by quantitative RT-PCR on lungs from either sensitive C57BL/6 or resistant BALB/c mice 7 and 14 days after bleomycin instillation and compared with a PBS control (Fig. 2). Bleomycin impact on two mouse strains was significantly different as evaluated by survival and histopathological analysis, as previously described [42]. Bleomycin led to an induction of miR-155 at both times in the two strains. Interestingly, this induction appeared significantly more pronounced in the sensitive C57BL/6 compared to the resistant BALB/c mice (Fig. 2). Overall, these data indicated that miR-155 can also be induced in an *in vivo* fibrogenic model and that its expression level was correlated with the degree of lung fibrosis.

mRNA profiling of miR-155-overexpressing fibroblasts

We then looked for fibroblast-specific targets of miR-155. To that end, we transfected lung fibroblasts HFL1 either with a synthetic pre-miR-155 or a "negative" pre-miRNA, used as a control. Two independent experiments were carried out and the expression of mature miR-155 was monitored with RQ-PCR. A ~500 fold induction of the miRNA was measured (data not shown). We then used human pan genomic arrays [43] to determine mRNA profiles and identify genes whose expression levels changed following miR-155 overexpression. The analysis was performed on RNA samples harvested at 24 h and 48 h post-transfection, as suggested by recent similar studies [29,30,44]. Statistical analysis revealed changes in the expression of 474 genes (197 up and 277 down-regulated) and 1404 genes (619 up

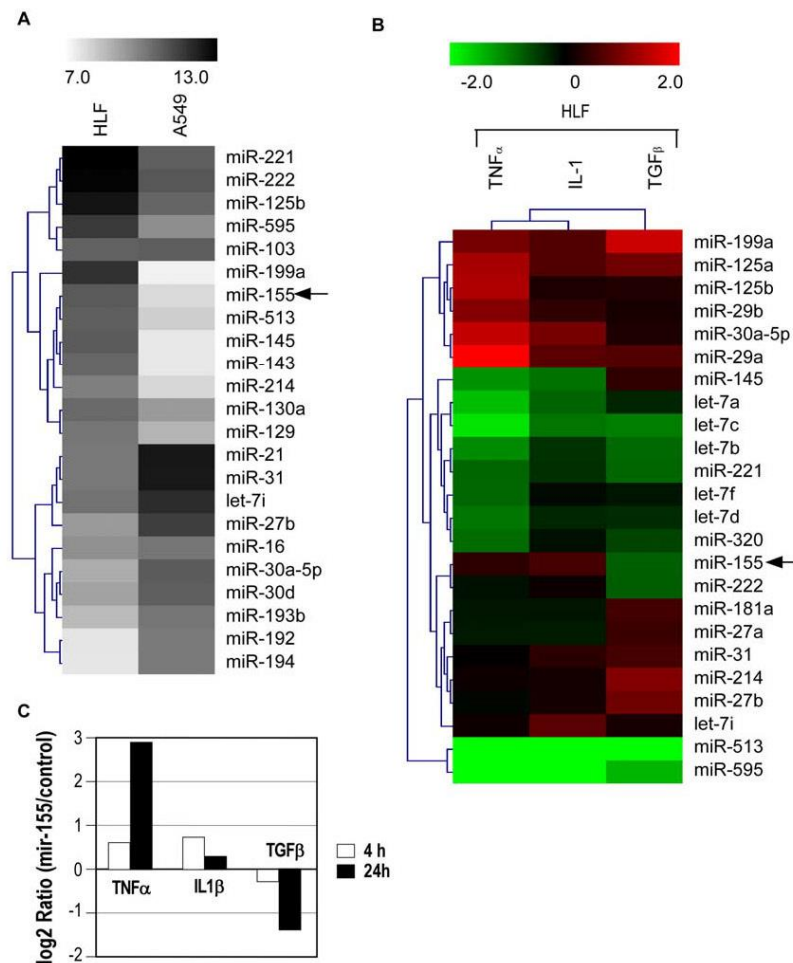


Figure 1. MiRNA expression data in human adenocarcinoma cells A549 and normal lung fibroblasts (CCD-19Lu) following a 24 h stimulation with TNF- α , IL-1 β or TGF- β . Cells were stimulated by the different cytokines and small RNA fraction from different biological conditions were chemically labelled and hybridized on a miRNA microarray as described in the Materials and Methods section. (A) Heatmap comparing control human pulmonary fibroblasts versus A549 adenocarcinoma cells. (B) Hierarchical clustering of miRNA modulated in normal human pulmonary fibroblasts following stimulation with 10 ng/ml TNF- α , IL-1 β and TGF- β . (C) Analysis of miR-155 expression levels by Taqman miRNA assay following a 4 or 24 h stimulation by the 3 cytokines.
doi:10.1371/journal.pone.0006718.g001

and 785 down-regulated) at 24 h and 48 h after transfection, respectively. As shown in Fig. 3A, the vast majority of modulated genes at 24 hours were also regulated at 48 hours. When the 2 sets of genes were analyzed by functional annotations, both lists were associated with similar biological functions such as “cell-to-cell signalling and interaction”, “cell death” and “cellular movement” (Table S2). Two distinct functional assays indeed confirmed these predictions: firstly, caspase-3 activity was increased in miR-155-transfected fibroblasts compared to

control cells (Fig. 4A), suggesting that miR-155 could promote apoptosis; Secondly, transfection of fibroblasts with miR-155 altered their migration. Cell motility was especially increased for fibroblasts migrating on a type I-collagen substrate, for which speed migration increased to 60% of basal (Fig. 4B). In agreement with these data, analysis of scratch wound repair on a collagen type I substrate indicated that a monolayer of fibroblasts expressing miR-155 was more rapidly repaired than a monolayer of control cells (Fig. 4C).

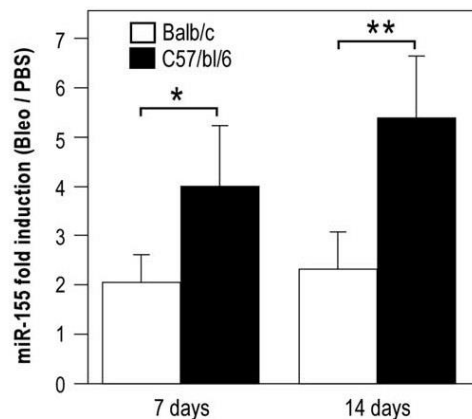


Figure 2. MiR-155 expression is associated with lung fibrosis in a murine model. Bleomycin-sensitive (C57BL/6) and resistant (BALB/c) mice were treated with bleomycin or PBS and killed at various times after instillation. Total RNA was extracted from lungs and miR-155 expression levels were performed by taqman miRNA assay. Histogram represents miR-155 fold induction between bleomycin and PBS for the 2 mice strains 7 and 14 days after instillation (n = 4 animals/group). doi:10.1371/journal.pone.0006718.g002

We observed after heterologous overexpression of miR-155 the reduced level of expression of a population of transcripts that corresponded to predicted targets of miR-155. Three independent prediction tools (TargetScan, Pictar and MicroCible, see materials and method section for calculation details) indicated an over-representation of miR-155 predicted targets in the population of down-regulated transcripts. Indeed, ~7 fold enrichment for the presence of a 8-nucleotide sequence complementary to the miR-155 “seed” was detected at 24 h (Fig. 3B). A ~3-fold enrichment was noticed at 48 h (Fig. 3B). Different prediction tools provided contrasted results, as visualized in the Venn diagrams depicted in Fig. 2C. While a total of 260 transcripts were predicted by at least one of this algorithm (Table S3), only 18 and 19 transcripts were predicted by all 3 bioinformatics tools at 24 and 48 hours, respectively. 15 transcripts were common to the 2 lists (Table 1). Importantly, 9 out of these 15 transcripts (BACH1, H3F3A, MAP3K7IP2, RAB11FIP2, SDCBP, SGK3, TOMM20, TSPAN14, YWHAZ) have already been described as miR-155 targets in immune models [27,29,30,45]. This experimental approach was also validated with the “Sylamer” approach described in [46]. Overexpression of miR-155 in fibroblasts at 24 h and at 48 h clearly led to a down-regulation of transcripts containing the following sequences in their 3’UTR: “GCATTA”, “GCATTAA”, “AGCATTA”, “AGCATTAA” (data not shown). These sequences indeed correspond to the sequences complementary to the miR-155 “seed” region. We noticed that the best miR-155 “seed” enrichment was obtained when predicted sites were selected in the 3’UTR rather than in the rest of the transcript (i.e. in the open reading frame and in the 5’UTR, data not shown).

FGF7/KGF is a miR-155 target

When we looked in the list of 15 transcripts whether one of these putative miR-155 targets was specific to the fibroblasts, FGF-7, a paracrine-acting epithelial mitogen produced by cells of mesen-

chymal origin, was identified. According to the TargetScanS algorithm, sequence alignment of the miR-155 complementary site in the 3’-UTR of KGF mRNA in human, mouse and dog allowed us to identify two conserved binding sites (Fig. 5A): i) binding site one (“seed” at position 1288–1293 and 1128–1133 after the transcription start site of the human and murine KGF mRNA respectively) which contains conserved “seed” and conserved anchoring adenosine; ii) binding site two (“seed” at position 2017–2022 and 1824–1829 of the human and murine KGF mRNA respectively) which contains both conserved “seed” and conserved anchoring adenosine plus a conserved Watson-Crick match at the eighth nucleotide (Fig. 5A). To evaluate whether miR-155 can alter the expression of KGF, we cloned a fragment of 919 and 787 bp of the human and murine KGF 3’-UTR mRNA (NM_002009 and NM_008008) containing the two putative miRNA-binding sites into the psiCHECKTM-2 vector (Fig. 3B) and transfected it into HEK 293 or NIH3T3 cells in the presence of either a human or murine synthetic pre-miR-155 analogue or a pre-miR-control. After normalization of the Renilla luciferase signal to the firefly luciferase signal, both human and murine pre-miR-155 induced a significant decrease in the normalized luciferase activity compared to control in the two cell types (Fig. 5B, upper panels). This effect was dose dependent as shown in Fig. 5B (lower panel).

Only miR-155-binding site 2 is functional

We then investigated whether one or both putative binding sites in KGF 3’UTR were functional. For this purpose, we generated two mutants targeting each seed of the 2 putative binding sites: MUT 1 for the putative binding site 1, MUT 2 for the putative binding site 2. A third mutant was built with both mutations: MUT1+MUT2 (Fig. 6A). Luciferase assay was performed with mutant and wild type 3’KGF UTR in HEK 293 cells. It demonstrated that miR-155 still efficiently inhibited luciferase activity after abrogation of the first seed while it had no inhibitory effect on the activity of MUT2 (Fig. 6B), indicating that only site 2 was functional. As expected, the luciferase activity of the double mutant was no more affected by miR-155. We next generated a minimal construct corresponding to binding site 2 (from position 1815 to 1837 in the murine KGF transcript, Site2-1X) and an additional construct containing a duplication of this sequence (Site2-2X). In agreement with previous data, miR-155 significantly inhibited the luciferase activity of the 2 constructs, the duplicated site construct being even more sensitive than the wild type 3’UTR KGF construct (Fig. 6C). Overall, these results demonstrated that only the second miR-155 binding site is functional in KGF 3’-UTR.

MiR-155 specifically attenuates inflammatory cytokines-induced KGF release by lung fibroblasts

IL-1 β is the most potent inducer of KGF in fibroblasts. Thus, we first assessed whether miR-155 overexpression in human fibroblasts could directly alter endogenous KGF release. Pre-miR-155 or a control pre-miRNA were transfected in lung fibroblasts in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/ml) and the production of KGF and of 3 inflammatory cytokines (CCL5/RANTES, MCP-1 and IL-8) was measured (Fig. 7). As expected, IL-1 β stimulation led to a strong induction of all four factors and addition of pre-miR-155 did not affect the expression level of CCL5 (Fig. 7A), MCP1 (Fig. 7B) and IL-8 (Fig. 7C). Importantly, KGF release by lung fibroblasts in response to IL-1 β was significantly decreased in cells transfected by miR-155 compared to control (Fig. 7D). The specific fraction of KGF release corresponding to IL-1 induction was indeed decreased to 45% of control (Fig. 7E). These results

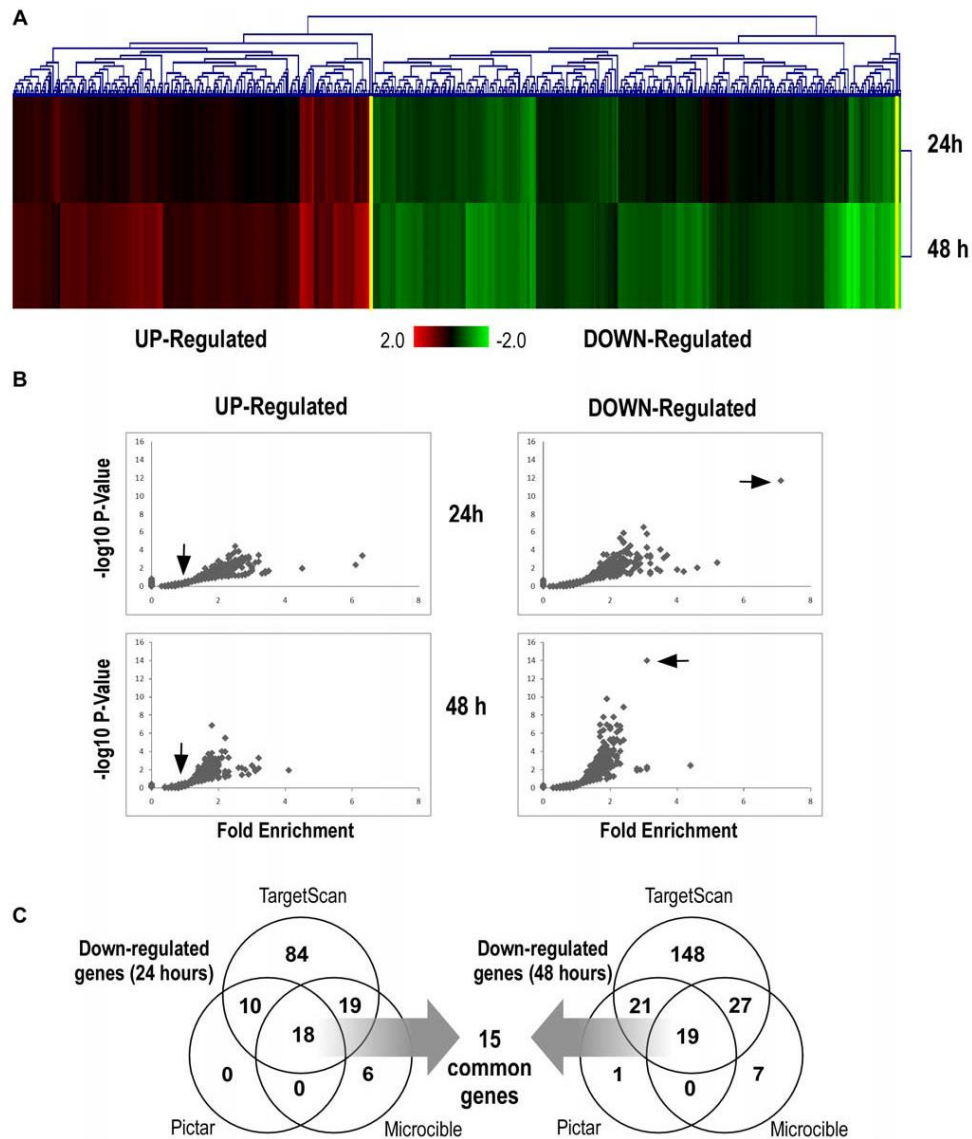


Figure 3. A large number of predicted targets are repressed after overexpression of miR-155. Lung fibroblasts were transfected with a synthetic pre-miR-155 or with a negative pre-miRNA (N = 2). RNA samples were harvested at 24 and 48 h post-transfection. mRNA profiles were determined with pan genomic arrays. (A) Heatmap comparing the normalized log₂ of the ratios between pre-miR-155 signal and the pre-miR-Neg signal, 24 h and 48 h after transfection. Clustering was performed using a Euclidian distance and a Ward method of agglomeration. Colours vary from green for the lowest ratios to red for the highest ratios. (B) Over-representation of miR-155 seed complementary sequences in the 3'-UTR of downregulated transcripts. Using our bioinformatics tool "MicroTopTable" (see materials and method), representation of miRNA seed-binding sequences in the set of up- or down-regulated genes was compared with the set of all expressed genes. For each miRNA seed, a fold enrichment value (horizontal axis) and an associated P-Value (vertical axis) were calculated. The arrow indicates miR-155. (C) Venn diagram comparing the number of miR-155 targets among the set of downregulated genes at 24 h and 48 h post-transfection according to 3 distinct target prediction tools (TargetScan, Pictar and MicroCible).
doi:10.1371/journal.pone.0006718.g003

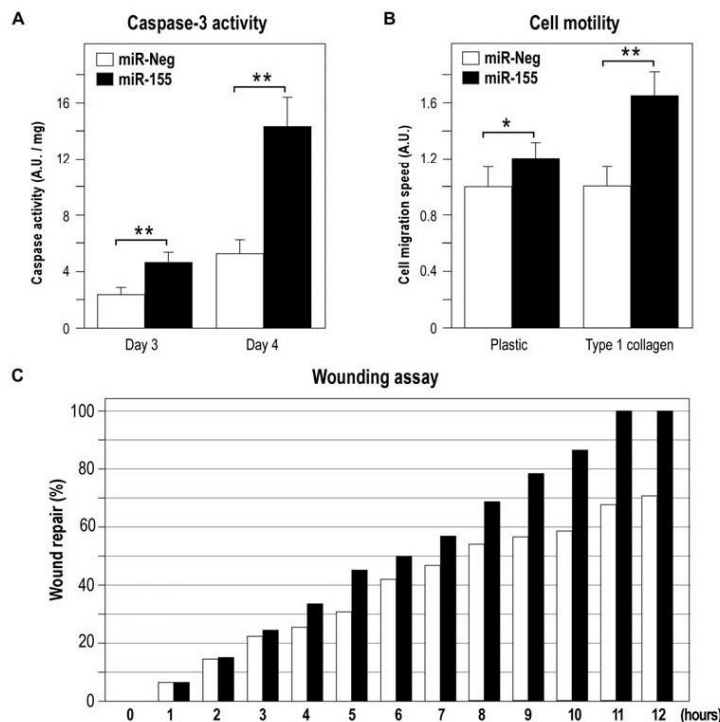


Figure 4. Transfection of human lung fibroblasts with pre-miR-155 increases caspase-3 activity and cell motility. Fibroblasts were transfected with either pre-miR-Neg or pre-miR-155 (10 nM). (A) Caspase 3/7 assay was carried out 3 and 4 days following transfection using a specific substrate as described in the method section ($n=3$). (B) A scratch wound was induced in confluent cell monolayers plated on plastic or on type I collagen and individual cell migration speed was evaluated on 20 independent cells ($n=2$). (C) Representative experiment showing the percentage of the repaired area in a scratch wound assay ($n=2$). doi:10.1371/journal.pone.0006718.g004

were confirmed by transfecting human lung fibroblasts either with a LNA-anti-miR-155 in order to block the endogenous expression of miR-155 or with a pre-miR-155 in order to increase the expression of miR-155 (Fig. 8A and 8B). Transfected cells were treated for 72 or 96 hours with the inflammatory cytokines TNF- α or IL-1 β . Interestingly, miR-155 knock-down was able to potentiate KGF release in both TNF- α and IL-1 β -stimulated HFL1. As expected, transfection of HFL1 with a pre-miR-155 strongly affected KGF release in the 3 culture conditions (Fig. 8A). These results strongly suggest that miR-155 is involved in the attenuation of KGF expression in lung fibroblasts following inflammatory cytokines stimulation (Fig. 8C).

Discussion

We have demonstrated for the first time that miR-155 could significantly decrease the release of KGF induced by IL-1 β or TNF- α in human normal pulmonary fibroblasts. Since KGF plays a central role in epithelial-mesenchymal interactions in lungs [47], our data suggest that an alteration in miR-155 expression level may have important pathophysiological impacts during acute lung injury or pulmonary diseases.

Several studies have reported that miR-155 expression is modulated in a number of physiological and pathological processes such as hematopoiesis, immunity, tumorigenesis and inflammation (for review, [48]). MiR-155 has been identified as a component of the primary response to several inflammatory mediators in different cell types [32–34]. It has been shown that miR-155 is induced by lipopolysaccharide (LPS), interferon (IFN), polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid (poly IC) or TNF- α in monocytes, macrophages and dendritic cells [32–34,49]. In addition, nuclear factor-kappa B and AP-1 transcription factors have been shown to regulate miR-155 expression [32,50,51]. Our results showing the stimulation of miR-155 by IL-1 β and TNF- α in human pulmonary fibroblasts fit well with these studies. These data are consistent with the high levels of miR-155 detected in synovial fibroblasts from Rheumatoid Arthritis patients, an autoimmune disorder associated with high inflammation at joint level [35]. Our observation showing an increased level of expression of miR-155 in a mouse model of lung fibrosis (Fig. 2) suggests a potential role for miR-155 during this physio-pathological process. The precise cellular location of miR-155 transcript has not been performed yet. It is tempting to speculate that the weak induction of KGF after stimulation by IL-1 observed in fibroblasts derived from

Table 1. miR-155 targets specific of human lung fibroblasts as determined by a combination of microarray analysis and of computational target search.

Name	ID	RNG	UNIGENE ID	ACCESSION NUMBER	DESCRIPTION	Log2 Ratio			Adj.P.Val		
						24 h	48 h		24 h	48 h	
ANTXR2	49597		Hs.162963	NM_058172	Anthrax toxin receptor 2 (ANTXR2), mRNA.	-1.30	-1.54		1.49E-05	3.82E-06	
BACH1	90782		Hs.154276	NM_001186NM_206866	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1 (BACH1), transcript variant 1, mRNA.	-0.85	-1.12		2.78E-04	4.75E-05	
CSNK1A1	91649		Hs.529862	NM_001025105NM_001892	Casein kinase 1, alpha 1 (CSNK1A1), transcript variant 2, mRNA.	-0.98	-1.29		1.53E-05	1.52E-06	
FGF7	129551		Hs.567268	NM_002009	Fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor) (FGF7), mRNA.	-0.78	-1.33		2.71E-03	9.21E-05	
FGF7	172697		Hs.567268	NM_002009AK054997	cDNA FL30435 fis, clone BRACE200031, weakly similar to KERATINOCYTE GROWTH FACTOR PRECURSOR.	-1.12	-1.55		6.86E-04	3.12E-05	
H3F3A	91945		Hs.546259	NM_002107	H3 histone, family 3A (H3F3A), mRNA.	-1.73	-2.31		3.64E-04	2.61E-05	
LRRC59	32621		Hs.370927	NM_018509	Leucine rich repeat containing 59 (LRRC59), mRNA.	-0.96	-0.98		6.91E-04	2.12E-04	
MAP3K7IP2	163253		Hs.269775	NM_145342NM_015093	Mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 2 (MAP3K7IP2), mRNA.	-1.26	-1.34		1.52E-04	1.81E-04	
RAB11FIP2	24644		Hs.173456	NM_014904	RAB11 family interacting protein 2 (class I) (RAB11FIP2), mRNA.	-1.37	-1.50		2.92E-04	8.41E-05	
SDCBP	11180		Hs.200804	NM_001007068NM_001007069; NM_001007070NM_005625NM_001007067	Syndecan binding protein (syntenin) (SDCBP), transcript variant 2, mRNA.	-0.99	-2.66		1.42E-03	3.26E-06	
SGK3	20197		Hs.545401	NM_001033578NM_170709NM_013257	Serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3 (SGK3), transcript variant 1, mRNA.	-0.63	-0.59		1.20E-03	7.22E-04	
TOMM20	143603		Hs.533192	NM_014765	Translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast) (TOMM20), mRNA.	-0.67	-0.86		3.50E-04	3.26E-05	
TSCA14	34406		Hs.368315	NM_018718	Testis specific, 14 (TSCA14), mRNA.	-1.03	-1.29		2.08E-05	3.96E-06	
TSHZ3	36819		Hs.278436	NM_020856	Teashirt zinc finger homeobox 3 (TSHZ3), mRNA.	-0.84	-0.92		1.62E-03	4.30E-04	
TSPAN14	42822		Hs.310453	NM_030927	Tetraspanin 14 (TSPAN14), mRNA.	-1.04	-0.76		1.08E-05	6.68E-06	
YWHAZ	98307		Hs.492407	NM_145690NM_003406	Tyrosine 3-monooxygenase/tyrosophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ), transcript variant 1, mRNA.	-0.68	-1.78		5.39E-05	3.88E-07	

The list corresponds to the 15 down-regulated genes found after miR-155 overexpression at both 24 and 48 hours and predicted as miR-155 targets by 3 prediction tools (TargetScan, PicTar and MicroCible). RNG oligo IDs give access to transcripts and probes annotations through the microarray information system Mediant (http://www.microarray.ir880/merge/index). log2Ratio corresponds to the logarithm (base 2) of the ratio of miR-155/miR-Neg and Adj.P.Val is the false discovery rate p-values using the Benjamini-Hochberg correction.
doi:10.1371/journal.pone.0006718.t001

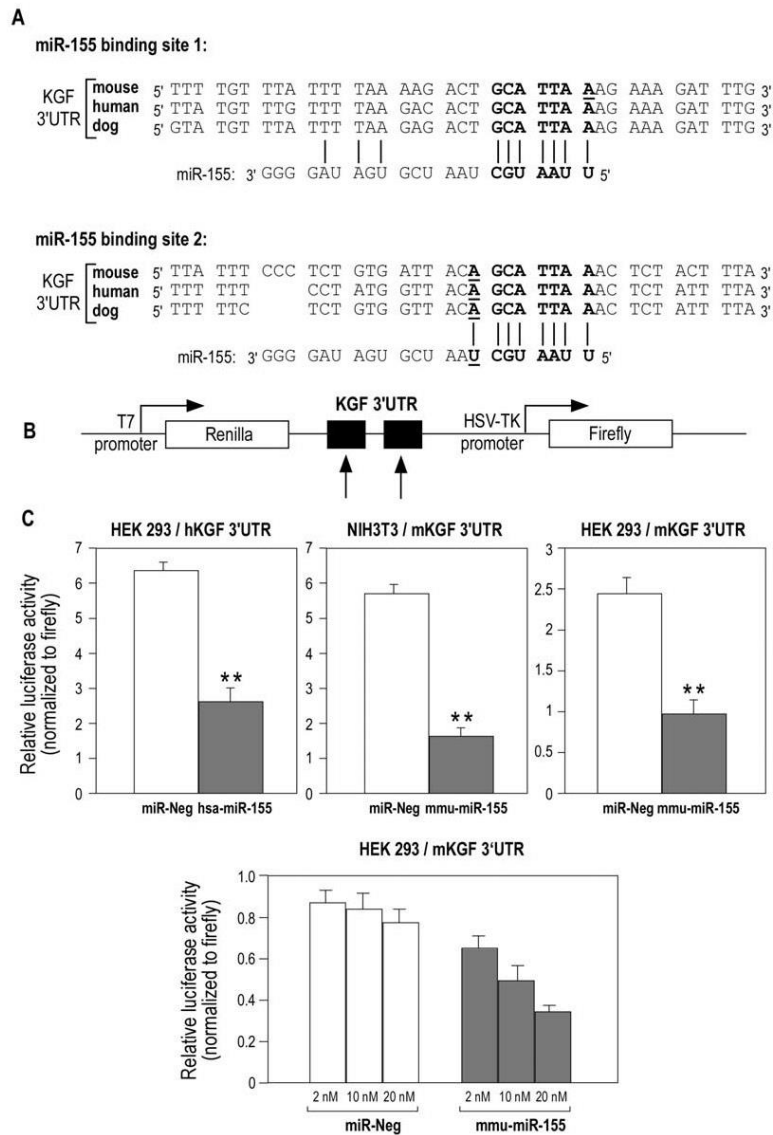


Figure 5. KGF mRNA is a primary target for miR-155. (A) Predicted interaction between miR-155 and the two putative binding sites in the KGF 3'UTR. Alignment of human, mouse and dog sequences in the 3'-UTR of KGF mRNA. The representation is limited to the region around the miR-155 complementary site. In bold, the "seed" region with a conserved anchoring adenosine (complementary to the first nucleotide of miR-155) and a conserved WC match to the eighth nucleotide of the miRNA. This latter is only present in binding site 2. (B) Schematic representation of the construct used in luciferase assay: a 919 bp and 787 bp region of the human and mouse KGF 3'-UTR containing the two putative miR-155 target sites (arrows) was cloned into the psiCHECK-2 vector. (C) Co-transfection of human or murine pre-miR-155 or pre-miR-Neg and of human or murine KGF 3'UTR-derived psiCHECK² construct in HEK 293 and NIH 3T3 cells show a significant decrease in normalized luciferase activity 48 h post-transfection in both cell types. Lower panel: dose-dependent inhibition of normalized luciferase activity in HEK 293 cells. ** indicates a p-value of less than 0.01 in a Student's t test.

doi:10.1371/journal.pone.0006718.g005

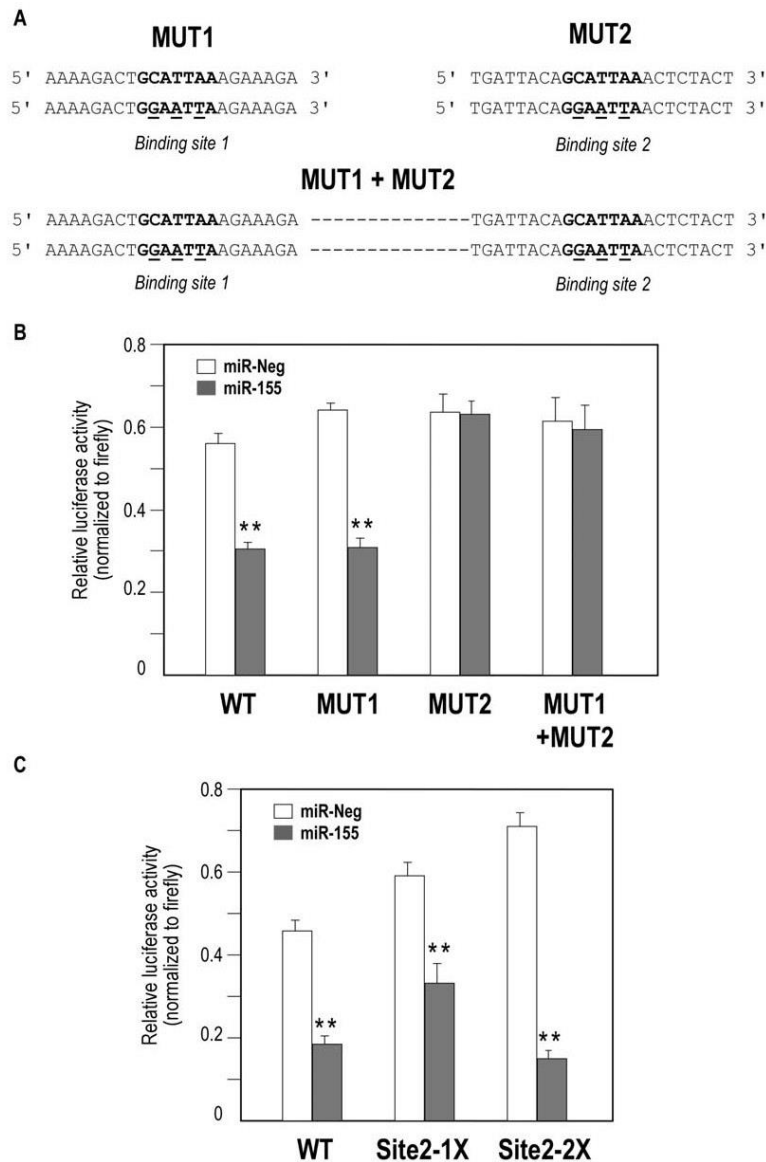


Figure 6. Only miR-155 putative binding site 2 is functional. (A) Generation by site-directed mutagenesis of murine fgf7 3'-UTR mutants in the "seed" of the putative binding sites (mutated bases are underlined): MUT 1 for the putative binding site 1, MUT 2 for the putative binding site 2 and a third mutant for both sites. (B) Co-transfection experiments of pre-miR-155 or pre-miR-Neg with these different constructs in HEK 293. Cells were harvested two days after transfection and luciferase activities were analyzed. All renilla luciferase activities were normalized with firefly luciferase activity. (C) HEK 293 cells were cotransfected with either pre-miR-155 or pre-miR-Neg together with different molecular constructs derived from pSf-check2 in which the second putative miR-155 binding site in FGF7 mRNA has been cloned once (1X) or twice (2X) behind the renilla luciferase gene. Cells were harvested two days after transfection, luciferase activities were analyzed and renilla luciferase activities were normalized with firefly luciferase activity. ** indicates a p-value of less than 0.01 in a Student's t test. doi:10.1371/journal.pone.0006718.g006

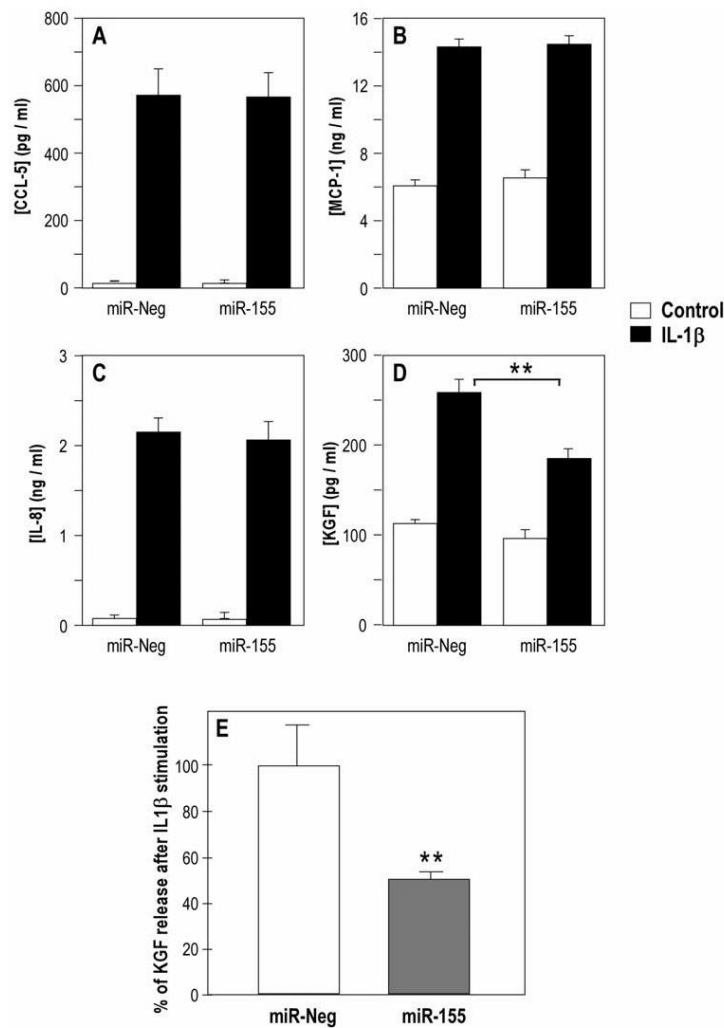


Figure 7. Transfection of human lung fibroblasts with pre-miR-155 inhibits IL-1 β induced KGF release. Panels A-D show a representative experiment of pre-miR-Neg or pre-miR-155 transfection (10 nM) effect on CCL5/RANTES, MCP-1, IL-8 and KGF release by lung fibroblast stimulated with 10 ng/ml IL-1 β . Results represent duplicates measurements of KGF by ELISA (R&D System) and duplicates measurements of CCL5, MCP-1 and IL-8 by FACS ArrayTM (human chemokine panel, Becton Dickinson) 48 h after transfection. Panel E summarizes the effect on KGF release by lung fibroblast stimulated by IL-1 β after transfection of pre-miR-Neg or of pre-miR-155. Results are expressed in percentage of KGF released after IL-1 β stimulation: pre-miR-155 decreases IL-1 β -mediated KGF release by approximately 45% compared to control. Results correspond to 3 independent experiments performed in duplicates. ** indicates a p-value of less than 0.01 in a Student's t test. doi:10.1371/journal.pone.0006718.g007

patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [52] is linked to an over-expression of miR-155 into these cells. Additional studies in the bleomycin-mouse model and on biopsies from IPF patients will help clarifying this important point.

Studies in hematopoietic, immune, and inflammatory cells as well as in hematologic and epithelial malignancies strongly suggest

that miR-155 is an essential molecule in the control of myelopoiesis, erythropoiesis and B and T cell development. In particular, the use of BIC/miR-155 deficient mice or transgenic animals overexpressing miR-155 in B-cell lineage (E-miR-155) have provided the identification of several important miR-155 targets in different immune cell types linked with its function in the

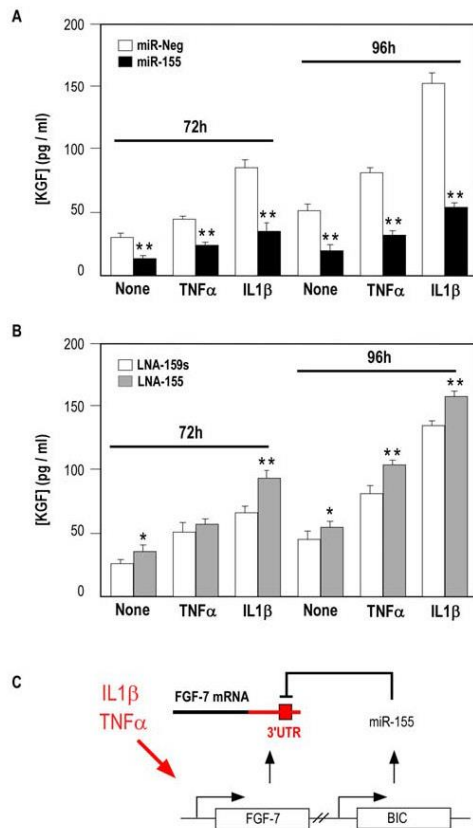


Figure 8. miR-155 overexpression or knock-down regulates KGF release in TNF- α or IL-1 β stimulated human lung fibroblasts. Panels A-B show a representative experiment of pre-miR-Neg/pre-miR-155 (10 nM) or LNA-159s/LNA-155 (25 nM) transfection effect on KGF release by lung fibroblast stimulated or not during 48 hours with 10 ng/ml TNF- α or IL-1 β . Results correspond to triplicates measurements of KGF by ELISA (R&D System). *: p-value<0.05; **: p-value<0.01. Panel C: model of miR-155-dependent attenuation of KGF release following fibroblasts stimulation with inflammatory cytokines. doi:10.1371/journal.pone.0006718.g008

activation of T and B lymphocytes, macrophages and dendritic cells [28–30,33,37,38]. Interestingly, BIC-deficient mice displayed significant remodeling of lung airways with age, associated with increased bronchiolar subepithelial collagen deposition and increased cell mass of sub-bronchiolar myofibroblasts. This is perfectly in line with our own observation, showing that miR-155 could have also additional functions in fibroblasts. It has been previously shown that miR-155 was expressed in primary lung fibroblasts in which it could regulate human angiotensin II type 1 receptor expression [40]. However, other putative functions of miR-155 in fibroblasts have not yet been documented. Our study provides a first attempt to identify the functional impact of miR-155 in normal human pulmonary fibroblasts.

In order to identify genes regulated by miRNAs in a specific cellular context, we have combined *in silico* and experimental approaches [53]. Several computational algorithms have been developed elsewhere to predict transcripts targeted by miRNAs [16,17,54,55]. They generally postulate that the 5' end of the miRNA, known as the "seed" region, forms perfect matches with the target sites and is usually conserved across species. However, slight differences in the different algorithms often lead to very distinct predictions. This clearly illustrates the limits of pure *in silico* approaches, and plainly justifies an experimental verification of these predictions. Incorporation of experimental data in the pipeline of analysis can be useful in order to take into account important parameters, such as the expression of the transcripts in a specific cellular context. Among several experimental approaches that are currently performed, the measurement of global gene expression after an ectopic expression of a specific miRNA deserves special interest. It usually induces a significant enrichment of predicted targets among the set of down-regulated transcripts. This suggests that most miRNAs, including miR-155 can indeed induce degradation of their mRNA targets [30,44,56]. We have validated this observation after alteration of several additional miRNAs (Lebrigand *et al*, manuscript in preparation). In our study, overexpression of miR-155 induces indeed a profound alteration of mRNA profiles associated with an over-representation of miRNAs predicted targets among the down-regulated transcripts. We calculated an enrichment score for miR-155 predicted targets in the set of downregulated transcripts, and compared it with the score of all other miRNAs. An ordered list of the miRNA compatible with a given set of downregulated transcripts was established, using "MicroTopTable", a bioinformatics web tool available at Mediane [73]. MicroTopTable also provided the location of the binding sites on the transcripts and the energy of complexes. It works with several possible prediction tools. All three prediction tools used in the present study (i.e. TargetScan, Pictar and MicroCible) performed similarly in terms of fold enrichment and significance. The list of targets common to the three bioinformatics tools only represented 7% of the total number of transcripts predicted by at least one method. For the sake of clarity, we restricted our work to the group with the strongest typology, but other interesting candidates should be further analyzed later. We also noticed that miR-155-associated target enrichment already occurred at 24 hours (Fig. 2B), as already suggested by others [57,58].

While the methodology described here worked finely for our project, its general application can possibly be weakened by a few limitations. A first possible drawback can be due to the high expression of miR-155 caused by the transfection, which does not reflect a physiological induction of this miRNA in HFL1. From that perspective, a supra-physiological concentration of miR-155 might induce adverse effects through alteration of "low affinity" targets. This is probably not the case here, since a final concentration of 0.15 nM of miR-155 induced a similar alteration of HFL1 transcriptome (data not shown). A second drawback could correspond to the saturation of the RISC complex by the heterologous expression of small RNAs, leading to an altered expression of genes controlled by endogenous miRNA, rather than by miR-155 [59]. This is also unlikely in these experiments, since we could not detect among upregulated transcripts any enrichment for a group of mRNA targeted by one of the miRNA highly expressed in fibroblasts. Based on our experience, we believe that the comparison of miRNAs and mRNAs expression profiles therefore provides a useful complement to pure computational predictions based solely on sequence information. It remains that even after such an analysis, the list of proposed miRNA targets still

require a direct validation by Western blot analyses and/or a reporter plasmid assays.

Functional annotations of the microarrays experiments led to the point that miR-155 has an impact on several biological functions in fibroblasts related to pathways such as “cell-to-cell signalling and interaction”, “cell death” and “cellular movement” (Table S2). Of note, an induction of caspase-3 activity and an increase in cell migration on type-I collagen was observed in fibroblasts transfected with miR-155. Modifications in cell motility can probably be linked to targeting of genes such as RHEB and CYR61, two important regulators of cell adhesion, which were validated by luciferase assays (Figure S1A). One biologically relevant network drawn from the lists of genes that were significantly modulated at 24 and at 48 h after miR-155 transfection is shown in Figure S1B. It contains five putative miR-155 targets. One can notice the strong modulation of genes associated with cell survival, such as Akt, and with migration, such as proteases and integrins (in particular ITGB1, the integrin β 1, one of the type I collagen receptor subunit). In line with this observation, a targeting by miR-155 of RhoA, a Rho GTPase, has recently been reported elsewhere [39]. Importantly, our list of putative miR-155 targets (Table S3) contains transcripts that were also identified in murine hematopoietic systems (namely BACH1, H3F3A, HIF1A, MAP3K7IP2, MYO10, RAB11FIP2, SDCBP, SGK3, TOMM20, TSPAN14, WEE1, YWHAZ) [29,30,59,60]. Such a conservation among species is certainly indicative of the likely impact of such interactions. Our list also share some common candidates with a study that identified several miR-155 targets in human mature dendritic cells [34]: BACH1, CMAT1, HNRPA3, MAP3K7IP7, PAPOLA and SERTAD2.

A central aspect of our work is related to the experimental screening of miR-155 targets specific to fibroblasts. This allowed the identification of KGF/FGF7, a central mediator of epithelial-mesenchymal interaction as a direct target of miR-155. KGF is a paracrine-acting, epithelial mitogen produced by cells of mesenchymal origin. KGF acts exclusively through FGFR2b, a subset of FGF receptor isoforms (for review [47]). KGF has been shown to be upregulated after epithelial injury in numerous conditions. Preclinical data from several animal models demonstrated that KGF could enhance the regenerative capacity of epithelial tissue [61–64]. Despite the important function of KGF in lung, the regulation of its production by lung fibroblasts is poorly understood [52]. Inflammatory mediators are known stimulants of KGF in fibroblasts. Among these mediators, IL-1 β appears to be the most potent inducer of KGF expression in fibroblasts derived from multiple tissues [65,66]. Previous studies have reported the presence of AP-1 sites in the promoter region of mouse and human KGF genes [67]. In lung or dermal fibroblast, it has been demonstrated that the IL-1 β induced KGF secretion is controlled through a balance between c-Jun and JunB. Indeed, KGF expression was enhanced in JunB $-/-$ fibroblast whereas KGF was hardly detectable in c-Jun $-/-$ fibroblasts [68].

Our observation of a specific role for miR-155 in that context appears of particular interest. Indeed, using KGF 3'-UTR luciferase constructs, we have demonstrated that KGF was a direct target of miR-155. Interestingly, luciferase assay performed with different KGF 3'-UTR mutants for the two putative miR-155 binding sites showed that only binding site two was responsible of miR-155-mediated KGF regulation. The binding site one contains the conserved “seed” and the anchoring adenosine whereas the binding site two contains also a conserved Watson-Crick match at the eighth nucleotide (m8M, according to the nomenclature established by [16]). This result indicates that the predicted binding site one is a false positive due to the lack of a conserved

Watson-Crick match at the eighth nucleotide of the miRNA and is in total agreement with previous studies reporting that the presence of m8M decreased the possibility of false positive compared to the sole presence of the “seed” and of the anchoring adenosine [16,53]. This point seems of particular importance for sites containing little 3' pairing support and “3' compensatory” sites such as the 2 binding sites discussed here.

We also demonstrated that miR-155 over-expression efficiently inhibited endogenous KGF following stimulation with inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . Conversely, miR-155 knock-down using LNA-antimiR-155 was able to potentialize KGF release in both TNF- α - or IL-1 β -stimulated HFL1 at both times (Fig. 5–6). Therefore, we propose a model in which both KGF mRNA and miR-155-derived primary transcript BIC are induced following inflammatory cytokines. According to this model, a subsequent accumulation of miR-155 would attenuate KGF production in a negative feedback mechanism (Fig. 8C). An alternative model would be that miR-155 attenuates the inflammatory intracellular pathway, as demonstrated recently [34] by directly targeting adaptor molecules of the TLR/IL1 signaling cascade such as MAP3K7IP7/TAB2. However, although TAB2 expression was found to be inhibited by miR-155 in our microarray experiments, we clearly showed that miR-155 specifically inhibited IL1-induced KGF production but did not affect the expression level of three other cytokines (CCL5, MCP1 and IL-8), indicating that in our model, miR-155 does not affect the TLR/IL1 signalling cascade.

In conclusion, this study provides a global characterization of miR-155 targets in human lung fibroblasts. It leads to the identification of KGF/FGF7 as a mesenchymal-specific miR-155 target. To date, this is the first report relating evidence for miRNA involvement in lung epithelial-mesenchymal interactions. Finally, this work provides new insights into the pathogenesis of lung fibrosis, by suggesting a role for miRNAs in the lung fibrotic process.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal care and experimental protocols were conducted in accordance with the regulations of the institutional care and use committee at the University of Lille 2. Personnel from the laboratory carried out all experimental protocols under strict guidelines to insure careful and consistent handling of the mice.

Cell Culture and Treatments

The human fibroblast cells HFL1 (CCL-153) derived from normal lung tissue [69], adenocarcinoma A549 cells, NIH 3T3 and HEK 293 were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in monolayer culture in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). IL-1 β , TNF- α and TGF- β (Upstate) were used at final concentration of 10 ng/ml.

RNA isolation from cell samples

Total RNA were extracted from the samples with TRIzol solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the integrity of RNA was assessed by using an Agilent BioAnalyser 2100 (Agilent Palo Alto, CA) (RIN above 7). The miRvana miRNA isolation kit was used for isolation and enrichment of small RNA fractions (Ambion, Austin, TX), according to the manufacturer's protocol.

Animal treatment

9–12 weeks old male C57BL/6 and Balb/C mice were purchased from Charles River, France. To induce fibrotic

changes, mice were intratracheally instilled with bleomycin or PBS as previously described [42]. Briefly, mice were anesthetized with sevoflurane inhalation (Abbott, UK) and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate bleomycin (0.75 unit/ml) or vehicle (PBS), in a volume of 80 μ l. Mice were sacrificed 7 and 14 days after instillation and lungs were removed for further analysis. Lung fibrosis was assessed by histopathology after fixation with 4% paraformaldehyde/PBS overnight at 4°C. The major criteria examined included interstitial thickening of alveolar or broncholar walls, collagen deposition, and inflammatory cell infiltration. Total RNA was extracted from lungs removed from PBS- and bleomycin-treated mice ($n = 4$ for both strains) as described above and used for assessment of miR-155 expression by quantitative RT-PCR.

Microarray procedure

miRNA microarray procedure. The oligonucleotide sequences corresponding to 2054 mature miRNAs (409 homo sapiens) found in the miRNA registry (Release 8.2; [10]) are available on <http://www.microarray.fr:8080/merge/index> (follow the link to "Ipmc MicroRNA-1k microarray v4"). Each oligonucleotide was spotted four times on each microarray (2 distinct pairs of spots), in order to reduce positional bias of the fluorescence readout. Experimental data and associated microarray designs have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under series GSE12033/GSE12035 and platform record GPL4717. Target preparation and array hybridization were performed as previously described [70,71]. Briefly, small RNA fraction was purified from 100 μ g total RNA with the miRvana miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX) and 5 μ g of small RNA fraction were then chemically labeled with the Alexa fluors (Ulysis kit, Invitrogen) as previously described [72]. Labeled RNA were then combined, purified and hybridized in 300 μ l hybridization buffer (Agilent hybridization buffer) for 16 hrs at 48°C in a dye-swap experiment. Arrays were then washed once at room temp in Agilent wash buffer (Agilent) for 5 min and then washed in Agilent wash buffer II at 37°C for 30 sec, spun dry and scanned with a Genepix scanner (Axon Instruments, Molecular Devices Corporation 3280 Whipple Road Union City, CA 94587 USA). TIF images containing the data from each fluorescence channel were quantified with the Genepix pro 6.0 program (Axon Instruments) using a 'circular features' quantification method.

Expression microarray procedure. Pangenomic microarrays were printed using human RNG/MRC oligonucleotide collection as previously described [43]. RNA were labelled and hybridized as described in Moreilhon et al [73]. Two biological replicates were performed for each comparison. Experimental data and associated microarray designs have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under serie GSE14477 and platform record GPL1456.

Statistical analysis. Normalizations were performed using the limma package available from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Intra slide and inter slide normalization were performed using the Print Tip Loess and the quantile methods respectively. Means of ratios from all comparisons were calculated and a B test analysis was performed using the Limma package available from Bioconductor. Differentially expressed genes were selected using a Benjamini-Hochberg correction of the p-value for multiple tests, based on a p-value below 0.05 and a fold change cut off ($\log_{2}(\text{Ratio}) > 0.5$).

Biological Theme Analysis. Data from expression microarrays were analyzed for enrichment in biological themes (Gene Ontology molecular function and biological process) and build

biological networks using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>) and Mediant [74], an information system containing diverse information about our probes set and the data sets (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>). Over-represented biological themes are shown in supplementary Table S1.

miR-155 targets analysis. Two in-house bioinformatics tools have been developed to predict miRNA targets (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index> follow the link to microRNA and Bioinformatic tools): i) MicroCible is a miRNA target predictor that scans transcripts sequences for the presence of "miRNA seed" complementary sequence. This search can be performed for different "seed" match type [53], a minimal free energy binding cutoff, and the location of the potential targeting site (i.e. 3'UTR or entire transcript); ii) MicroTopTable is dedicated to the search of putative enrichments in miRNA predicted binding sites among a set of modulated genes for different prediction softwares (i.e. Miranda, MicroCible, TargetScan or PicTar). MicroTopTable ranks the transcripts into three categories ("Upregulated", "Down regulated" and "non-modulated"), according to thresholds for expression level and for differential expression. MicroTopTable then calculates the number of predicted targets for each miRNA, according to the prediction software selected, in each of the three categories. Enrichment in miRNA targets in each category is then tested using the hypergeometric function.

Quantitative RT-PCR of mature miRNA

miR-155 expression in cytokines-stimulated fibroblasts was evaluated using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) as specified in their protocol. Real-time PCR was performed using GeneAmp Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and ABI 7900HT real-time PCR machine. All reactions were performed in duplicate. Expression levels of mature microRNAs were evaluated using comparative CT method (2-deltaCT). Transcript levels of let-7a and RNU6B was used as endogenous control.

Molecular constructs

Various molecular constructs were derived from psiCHECKTM-2 (Promega) by cloning behind the renilla luciferase ORF sequences from fgf7 3'-UTR mRNA. For human and murine full length KGF 3'UTR cloning, a 919 and 787 nt sequence encompassing two putative miR-155 binding sites from human and mouse FGF7 3'UTR respectively was amplified using the primers listed in "Online Supplementary Materials S1" and cloned in the XhoI and NotI restriction sites. Mutations were introduced by site-directed mutagenesis in mice fgf7 3'UTR miR-155 putative binding sites using the QuickChange Kit (Stratagene). Primers used for site-directed mutagenesis are listed in "Online Supplementary Materials S1". In order to analyze in details the sequence targeted by miR-155 in fgf7 3'UTR we derived several constructs from the second miR-155 binding site. Complementary oligonucleotides referenced in "Online Supplementary Materials S1" (50 μ M final concentrations) were mixed with 10X Oligo Annealing Buffer (Invitrogen) heated 95°C for 4 minutes and allowed to cool at room temperature for 10 min. Diluted (10 nM) dsDNA were subsequently cloned in XhoI/NotI restriction sites in the pSI-Check2 (Promega). Site2-1X corresponds to the sequence 1815 to1837 of the murine fgf7 messenger. In the Site2-2X, the 22 nt sequence encompassing the miR-155 "seed" match has been duplicated.

Transfection and luciferase assays

Pre-miRNAs overexpression in HFL1. pre-miR-155 and control miRNA (miR-Neg # 1) were purchased from Ambion.

HFL1 cells were grown in 10% FCS in DMEM and transfected at 50% confluency in 6-well plates using Lipofectamin RNAi MAXTM (Invitrogen) with pre-miRNA at a final concentration of 10 nM.

Pre-miRNAs and psiCHECKTM-2 plasmid constructs co-transfection. NIH 3T3 and HEK 293 cells were cultured in 10% FCS in DMEM until confluency. Then, cells were plated into 48-well plates at a density of 26.5×10^3 cells/well and cotransfected using lipofectamin 2000TM (Invitrogen) with 0.4 μ g of psiCHECKTM-2 plasmid construct and pre-miR-155 or control miRNA at a final concentration of 10 nM. 48 hours after transfection, Firefly and Renilla Luciferase activities were measured using the Dual-GloTM Luciferase assay (Promega).

Assessment of KGF production from lung fibroblast. Pre-miR-155 and control miRNA (miR-Neg # 1) were purchased from Ambion; LNA anti-miR-155 and a control LNA inhibitor (LNA-159s) were purchased from Exiqon. Adult or embryonal lung fibroblast cells were cultured in 10% FCS in DMEM until confluency. Then, cells were plated into 6-well plates at a density of 4.10^6 cells/well and transfected using lipofectamin RNAi MAXTM (Invitrogen) with pre-miRNAs or LNA-anti-miRs at a final concentration of 10 nM and 25 nM respectively. Twenty four hours after transfection, cells were washed in PBS, and medium was replaced by DMEM without serum. Then cells were stimulated with IL-1 β or TNF- β at a final concentration of 10 ng/ml. At different times after stimulation, supernatants were collected and KGF was measured by ELISA kit purchased from R&D Systems according to manufacturer's protocol.

Cytokine assay

MCP-1, IL-8 and CCL5 assays were performed using the BD FACSAArrayTM Bioanalyser (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) according to manufacturer's protocol. Cytokine assays were measured in 50 μ l of conditioned media.

Caspase 3/7 assay

The activation of executioner caspase-3 and -7 was determined using the Caspase-Glo 3/7 Assay kit according to manufacturer's instructions from Promega (Madison, WI). Cells were plated in triplicate in 96-well plates and transfected as described above. Samples were read after 1 hr of incubation with the caspase substrate on a luminometer.

In Vitro Wound-Scratching Assay

Cells were plated on noncoated or collagen-type I-coated 12-well plates and transfected as described above. Twenty four hours after transfection, confluent cells were wounded by a pipet tip. The *in vitro* wound-healing process was then recorded by videomicroscopy for 24 h from the scratching on an Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with 37°C and 5% CO₂ regulated insert (Pecon GmbH, Germany). Brightfield images were taken each hour through a 10 \times phase contrast objective with a CoolSNAPHQ CCD Camera managed by Metamorph Software (Roper Scientific, Evry, France). The motility of the cells was evaluated by the determination of the repaired area percentage and of the cell migration speed using the ImageJ software.

Statistical analysis

Results are given as mean \pm S.E.M. Statistical analyses were performed by using Student's t-test as provided by Microsoft ExcelTM and the null hypothesis was rejected at the 0.05 level.

Supporting Information

Online Supplemental Material S1

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006718.s001 (0.04 MB DOC)

Figure S1 Validation of miR-155 targets and hypothetical model of miR-155 in the regulation of fibroblasts apoptosis and motility. (A) miR-155 targets 3'UTR mRNAs of RHEB, POLE3, CYR61 and H3F3A. HEK 293 cells were co-transfected with pre-miR-155 or pre-miR-Neg and different pSi-CHECK constructs as described in the Materials and Methods section. Transfection of pre-miR-155 induces a significant decrease in normalized luciferase activity 48 h post-transfection for all 3'UTR tested. (B) Ingenuity Pathway Analysis identifies a network of genes potentially modulated by miR-155 and involved in cell survival and migration. The network is displayed graphically as nodes (genes/gene products) and edges (the biological relationships between the nodes). Red and green nodes correspond to up- and down-regulated genes after a 24 (left) or 48 h (right) pre-miR-155 transfection experiment. As described in the legend provided, nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product. Edges are displayed with various labels that describe the nature of the relationship between the nodes (A, activation; B, binding; E, expression; I, inhibition; P, phosphorylation; T, transcription). Edges without a label represent binding only. Grey nodes were identified by the pathway analysis as part of the network. The putative inhibitory action of miR-155 on 5 gene products has been represented. AREG: amphiregulin; ADAM: ADAM metalloproteinase domain; CTGF: connective tissue growth factor; CYR61: cysteine-rich, angiogenic inducer, 61; FERMT2: fermitin family homolog 2; IGFBP3: insulin-like growth factor binding protein 3; ITGAV: integrin, alpha V; ITGB: integrin, beta; JAM: junctional adhesion molecule; MMP1: matrix metalloproteinase 1; MYO10: myosin X; PKN2: protein kinase N2; PRKCI: protein kinase C, iota; RHEB: Ras homolog enriched in brain; SH3D19: SH3 domain containing 19; SULF1: sulfatase 1; THBS2: thrombospondin 2; VCAN: versican. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006718.s002 (0.98 MB TIF)

Table S1 Main differentially expressed miRNAs between HFL1 and A549 cells. RNG oligo IDs give access to transcripts and probes annotations through our system of information Mediante (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>). Expression values correspond to the mean of fluorescence intensity for each probe. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006718.s003 (0.05 MB PDF)

Table S2 GO Database functional analysis of the genes regulated in response to miR-155 overexpression. Most significant themes identified by Ingenuity Pathway analysis. The genes modulated between miR-155 and miR-Neg transfected samples at two time points (24 h and 48 h) are listed in each case. The p value was calculated as a Fisher's exact probability. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006718.s004 (0.10 MB PDF)

Table S3 Full list of the miR-155 predicted targets down-regulated following miR-155 overexpression in HFL1. The 260 transcripts predicted to be miR-155 targets by at least one of the following algorithm: TargetScan, Pictar and MicroCible, are listed. Logarithm (base 2) of the ratio of miR-155/miR-Neg and false discovery rate p-values using the Benjamini-Hochberg correction are represented. ID: correspond to RNG oligo IDs that give access to transcripts and probes annotations through our system of information Mediante (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006718.s005 (0.10 MB PDF)

Acknowledgments

We acknowledge the excellent support of the Nice-Sophia Antipolis Transcriptome Platform of the Marseille-Nice Genopole in which the microarray experiments were carried out. The authors also thank Julie Cazareth for excellent technical assistance concerning the flow cytometry array experiments, Frédéric Braud for his expertise concerning time-lapse

videomicroscopy and Anne Engels for her assistance for the bleomycin experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NP TM PB BM. Performed the experiments: NP TM BC MPP TB CLLC EC GR SF BM. Analyzed the data: NP TM BC MPP KL KRS PB BM. Contributed reagents/materials/analysis tools: KL KRS JMLG BC. Wrote the paper: NP PB BM.

References

- Donjacour AA, Cunha GR (1991) Stromal regulation of epithelial function. *Cancer Treat Res* 53: 335–364.
- Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48: 509–517.
- Fromigue O, Louis K, Dayem M, Milanini J, Pages G, et al. (2003) Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 22: 8487–8497.
- Selman M, Pardo A (2004) Idiopathic pulmonary fibrosis: misunderstandings between epithelial cells and fibroblasts? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 21: 165–172.
- Mercier I, Casimiro MC, Wang C, Rosenberg AL, Quong J, et al. (2008) Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation and RB tumor suppressor functional inactivation: Implications for the response to hormonal therapy. *Cancer Biol Ther* 7: 1212–1225.
- Pardo A, Selman M (2002) Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* 7: d1743–1761.
- Gharraee-Kermiani M, Phan SH (2001) Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. *Curr Pharm Des* 7: 1083–1103.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862.
- Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 342: 129–138.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663–4670.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, et al. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432: 235–240. Epub 2004 Nov 2007.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231–235. Epub 2004 Nov 2007.
- Peters L, Meister G (2007) Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26: 611–623.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9: 102–114.
- Lewis BF, Burge CB, Bartel DP (2003) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15–20.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of MicroRNA-Target Recognition. *PLoS Biol* 3: e85.
- Doench JO, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18: 504–511.
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Gohub TR, Mootha V, et al. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338–345.
- Sheedy FJ, O'Neill LA (2008) Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3: iii50–55.
- Tam W, Ben-Yehuda D, Hayward WS (1997) bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukemia virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol* 17: 1490–1502.
- Tam W (2001) Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* 274: 157–167.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronesi A, Spizzo R, et al. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65: 7065–7070.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, et al. (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3627–3632.
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, et al. (2005) BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207: 243–249.
- Jung I, Aguiar RC (2009) MicroRNA-155 expression and outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 144: 138–140.
- Yin Q, McBride J, Fewell C, Lacey M, Wang X, et al. (2008) MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol* 82: 5295–5306.
- Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, et al. (2007) Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316: 604–608.
- Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, et al. (2007) microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 27: 847–859.
- Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, et al. (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316: 608–611.
- Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, et al. (2009) Cutting edge: The Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol* 182: 2578–2582.
- O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1604–1609.
- Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinescu S, Dumitru CD, et al. (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 179: 5082–5089.
- Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, et al. (2009) MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2735–2740.
- Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, et al. (2008) Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 1001–1009.
- Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PL, Aguiar RC (2008) Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 181: 8–15.
- Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai TH, et al. (2008) MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 28: 630–638.
- Teng G, Hakimpour P, Landgraf P, Rice A, Tuschli T, et al. (2008) MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28: 621–629.
- Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, et al. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 28: 6773–6784.
- Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, Schmittgen TD, Elton TS (2006) MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 281: 18277–18284.
- Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, et al. (2007) Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16170–16175.
- Pottier N, Chupin C, Defamie V, Cardinaud B, Sutherland R, et al. (2007) Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3? *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1098–1107.
- Le Brigand K, Russell R, Moreillon C, Rouillard JM, Jost B, et al. (2006) An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res* 34: e87.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, et al. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769–773. Epub 2005 Jan 2030.
- Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, et al. (2007) A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450: 1096–1099.
- van Dongen S, Abreu-Goodger C, Enright AJ (2008) Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. *Nat Methods* 5: 1023–1025.
- Finch PW, Rubin JS (2004) Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv Cancer Res* 91: 69–136.
- Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E (2009) miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*.

49. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12481–12486.
50. Khiver J, van den Berg A, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, et al. (2007) Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene* 26: 3769–3776.
51. Yin Q, Wang X, McBride J, Fewell C, Flemington E (2008) B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element. *J Biol Chem* 283: 2654–2662.
52. Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, Legrand A, Cohen M, et al. (2005) Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 470–477.
53. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233.
54. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, et al. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495–500.
55. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, et al. (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126: 1203–1217.
56. Huang J, Liang Z, Yang B, Tian H, Ma J, et al. (2007) Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem* 282: 33632–33640.
57. Wang X (2006) Systematic identification of microRNA functions by combining target prediction and expression profiling. *Nucleic Acids Res* 34: 1646–1652.
58. Cheng C, Li LM (2008) Inferring microRNA activities by combining gene expression with microRNA target prediction. *PLoS ONE* 3: e1989.
59. Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander G, Leslie CS, et al. (2009) Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27: 549–555.
60. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, et al. (2008) Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 205: 583–594.
61. Ulich TR, Yi ES, Longmire K, Yin S, Biltz R, et al. (1994) Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 93: 1298–1306.
62. Yi ES, Williams ST, Lee H, Malicki DM, Chin EM, et al. (1996) Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol* 149: 1963–1970.
63. Wu KI, Pollack N, Panos RJ, Sporn PH, Kamp DW (1998) Keratinocyte growth factor promotes alveolar epithelial cell DNA repair after H₂O₂ exposure. *Am J Physiol* 275: L780–L787.
64. Atabai K, Ishigaki M, Geiser T, Ueki I, Matthay MA, et al. (2002) Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L163–L169.
65. Brauchle M, Angermeyer K, Hubner G, Werner S (1994) Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 9: 3199–3204.
66. Tang A, Gilchrist BA (1996) Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 11: 41–50.
67. Finch PW, Lengel C, Chedid M (1995) Cloning and characterization of the promoter region of the human keratinocyte growth factor gene. *J Biol Chem* 270: 11230–11237.
68. Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, et al. (2000) c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103: 745–755.
69. Mari BP, Anderson IC, Mari SE, Ning Y, Lutz Y, et al. (1996) Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 273: 618–626.
70. Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennisser Y, et al. (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315: 1579–1582.
71. Saumet A, Vetter G, Bouttier M, Portales-Casamar E, Wasserman WW, et al. (2006) Transcriptional repression of microRNA genes by PML-RARA increases expression of key cancer proteins in acute promyelocytic leukemia. *Blood*.
72. Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR (2004) Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA* 10: 1813–1819.
73. Moreilhon C, Gras D, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, et al. (2005) Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics* 20: 244–255.
74. Le Brigand K, Barbry P (2007) Medante: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* 23: 1304–1306.

Bibliographie

- Aamar, E., and I.B. Dawid. 2008. Isolation and expression analysis of foxj1 and foxj1.2 in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol.* 52:985-991.
- Aarbiou, J., M. Ertmann, S. van Wetering, P. van Noort, D. Rook, K.F. Rabe, S.V. Litvinov, J.H. van Krieken, W.I. de Boer, and P.S. Hiemstra. 2002. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *Journal of leukocyte biology.* 72:167-174.
- Abu-Halima, M., C. Backes, P. Leidinger, A. Keller, A.M. Lubbad, M. Hammadeh, and E. Meese. 2013. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril.*
- Adair, W.S. 1985. Characterization of Chlamydomonas sexual agglutinins. *J Cell Sci Suppl.* 2:233-260.
- Adams, M., R.J. Simms, Z. Abdelhamed, H.R. Dawe, K. Szymanska, C.V. Logan, G. Wheway, E. Pitt, K. Gull, M.A. Knowles, E. Blair, S.H. Cross, J.A. Sayer, and C.A. Johnson. 2012. A meckelin-filamin A interaction mediates ciliogenesis. *Human molecular genetics.* 21:1272-1286.
- Adriaensen, D., and D.W. Scheuermann. 1993. Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *The Anatomical record.* 236:70-85; discussion 85-76.
- Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell, and G.H. Gudmundsson. 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood.* 96:3086-3093.
- Ahmad, S., P.E. Martin, and W.H. Evans. 2001. Assembly of gap junction channels: mechanism, effects of calmodulin antagonists and identification of connexin oligomerization determinants. *Eur J Biochem.* 268:4544-4552.
- Akabas, M.H. 2000. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *The Journal of biological chemistry.* 275:3729-3732.
- Algrain, M., O. Turunen, A. Vaheri, D. Louvard, and M. Arpin. 1993. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *The Journal of cell biology.* 120:129-139.
- Alliegro, M.C. 2008. The implications of centrosomal RNA. *RNA Biol.* 5:198-200.
- Alliegro, M.C., M.A. Alliegro, and R.E. Palazzo. 2006. Centrosome-associated RNA in surf clam oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103:9034-9038.
- Ambros, V. 1989. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell.* 57:49-57.
- Ambros, V., and H.R. Horvitz. 1984. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 226:409-416.
- Ambros, V., and H.R. Horvitz. 1987. The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes & development.* 1:398-414.
- Andersen, J.S., C.J. Wilkinson, T. Mayor, P. Mortensen, E.A. Nigg, and M. Mann. 2003. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature.* 426:570-574.
- Anderson, R.G. 1972. The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *The Journal of cell biology.* 54:246-265.
- Anderson, R.G., and R.M. Brenner. 1971. The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. *The Journal of cell biology.* 50:10-34.
- Arai, D., A. Hatano, and T. Higashinakagawa. 2009. oled, a medaka Polycomb group gene, regulates ciliogenesis and left-right patterning. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 14:1359-1367.
- Arasu, P., B. Wightman, and G. Ruvkun. 1991. Temporal regulation of lin-14 by the antagonistic action of two other heterochronic genes, lin-4 and lin-28. *Genes & development.* 5:1825-1833.

- Arce, C.A., J.A. Rodriguez, H.S. Barra, and R. Caputo. 1975. Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem.* 59:145-149.
- Artavanis-Tsakonas, S., and M.A. Muskavitch. 2010. Notch: the past, the present, and the future. *Current topics in developmental biology.* 92:1-29.
- Artavanis-Tsakonas, S., M.A. Muskavitch, and B. Yedvobnick. 1983. Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 80:1977-1981.
- Azimzadeh, J., and W.F. Marshall. 2010. Building the centriole. *Current biology : CB.* 20:R816-825.
- Bae, Y., T. Yang, H.C. Zeng, P.M. Campeau, Y. Chen, T. Bertin, B.C. Dawson, E. Munivez, J. Tao, and B.H. Lee. 2012. miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Human molecular genetics.* 21:2991-3000.
- Baldauf, S.L. 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science.* 300:1703-1706.
- Baldauf, S.L., A.J. Roger, I. Wenk-Siefert, and W.F. Doolittle. 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science.* 290:972-977.
- Baldwin, F. 1994. Basal cells in human bronchial epithelium. *The Anatomical record.* 238:360-367.
- Balestra, F.R., P. Strnad, I. Fluckiger, and P. Gonczy. 2013. Discovering Regulators of Centriole Biogenesis through siRNA-Based Functional Genomics in Human Cells. *Developmental cell.* 25:555-571.
- Balough, K., M. McCubbin, M. Weinberger, W. Smits, R. Ahrens, and R. Fick. 1995. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology.* 20:63-70.
- Bals, R., and P.S. Hiemstra. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.* 23:327-333.
- Bals, R., X. Wang, M. Zasloff, and J.M. Wilson. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9541-9546.
- Bang, P.I., W.F. Sewell, and J.J. Malicki. 2001. Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of comparative neurology.* 438:173-190.
- Bao, J., D. Li, L. Wang, J. Wu, Y. Hu, Z. Wang, Y. Chen, X. Cao, C. Jiang, W. Yan, and C. Xu. 2012. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *The Journal of biological chemistry.* 287:21686-21698.
- Barbier, D., I. Garcia-Verdugo, J. Pothlichet, R. Khazen, D. Descamps, K. Rousseau, D. Thornton, M. Si-Tahar, L. Touqui, M. Chignard, and J.M. Sallenave. 2012. Influenza A induces the major secreted airway mucin MUC5AC in a protease-EGFR-extracellular regulated kinase-Sp1-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47:149-157.
- Barbry, P., and P. Hofman. 1997. Molecular biology of Na⁺ absorption. *The American journal of physiology.* 273:G571-585.
- Barbry, P., and M. Lazdunski. 1996. Structure and regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Ion channels.* 4:115-167.
- Barnes, B.G. 1961. Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *Journal of ultrastructure research.* 5:453-467.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-297.
- Barton, A.D., and R.V. Lourenco. 1973. Bronchial secretions and mucociliary clearance. Biochemical characteristics. *Archives of internal medicine.* 131:140-144.
- Basbaum, C.B., B. Jany, and W.E. Finkbeiner. 1990. The serous cell. *Annual review of physiology.* 52:97-113.
- Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C.G. Woods, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2006. Flies without centrioles. *Cell.* 125:1375-1386.

- Baum, B., and M. Georgiou. 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of cell biology*. 192:907-917.
- Bazzini, A.A., M.T. Lee, and A.J. Giraldez. 2012. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 336:233-237.
- Beckers, A., L. Alten, C. Viebahn, P. Andre, and A. Gossler. 2007. The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:15765-15770.
- Bellomo, D., A. Lander, I. Harragan, and N.A. Brown. 1996. Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 205:471-485.
- Bellusci, S., R. Henderson, G. Winnier, T. Oikawa, and B.L. Hogan. 1996. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development*. 122:1693-1702.
- Berbari, N.F., A.K. O'Connor, C.J. Haycraft, and B.K. Yoder. 2009. The primary cilium as a complex signaling center. *Current biology : CB*. 19:R526-535.
- Berezikov, E. 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature reviews. Genetics*. 12:846-860.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409:363-366.
- Bertero, T., C. Gastaldi, I. Bourget-Ponzio, B. Mari, G. Meneguzzi, P. Barbry, G. Ponzio, and R. Rezzonico. 2013a. CDC25A targeting by miR-483-3p decreases CCND-CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. *Cell death and differentiation*. 20:800-811.
- Bertero, T., K. Robbe-Sermesant, K. Le Brigand, G. Ponzio, N. Pottier, R. Rezzonico, N.M. Mazure, P. Barbry, and B. Mari. 2013b. microRNAs target identification: lessons from hypoxamiRs. *Antioxidants & redox signaling*.
- Bettencourt-Dias, M., A. Rodrigues-Martins, L. Carpenter, M. Riparbelli, L. Lehmann, M.K. Gatt, N. Carmo, F. Balloux, G. Callaini, and D.M. Glover. 2005. SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Current biology : CB*. 15:2199-2207.
- Bhaskaran, M., Y. Wang, H. Zhang, T. Weng, P. Baviskar, Y. Guo, D. Gou, and L. Liu. 2009. MicroRNA-127 modulates fetal lung development. *Physiological genomics*. 37:268-278.
- Billet, A., and J.W. Hanrahan. 2013. The secret life of CFTR as a calcium-activated chloride channel. *The Journal of physiology*.
- Billett, F.S., and R.P. Gould. 1971. Fine structural changes in the differentiating epidermis of *Xenopus laevis* embryos. *J Anat*. 108:465-480.
- Bisgrove, B.W., B.S. Snarr, A. Emrazian, and H.J. Yost. 2005. Polaris and Polycystin-2 in dorsal forerunner cells and Kupffer's vesicle are required for specification of the zebrafish left-right axis. *Developmental biology*. 287:274-288.
- Blanquart, C., I. Giuliani, O. Houcine, C. Jeulin, C. Guennou, and F. Marano. 1995. In vitro exposure of rabbit tracheal epithelium to SO(2): Effects on morphology and ciliary beating. *Toxicol In Vitro*. 9:123-132.
- Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*. 90:281-291.
- Blower, M.D., E. Feric, K. Weis, and R. Heald. 2007. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *The Journal of cell biology*. 179:1365-1373.
- Bobinnec, Y., M. Moudjou, J.P. Fouquet, E. Desbruyeres, B. Edde, and M. Bornens. 1998. Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell motility and the cytoskeleton*. 39:223-232.
- Boers, J.E., A.W. Ambergen, and F.B. Thunnissen. 1998. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 157:2000-2006.

- Boers, J.E., A.W. Ambergen, and F.B. Thunnissen. 1999. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 159:1585-1591.
- Bombieri, C., S. Giorgi, S. Carles, R. de Cid, F. Belpinati, C. Tandoi, N. Pallares-Ruiz, C. Lazaro, B.M. Ciminelli, M.C. Romey, T. Casals, F. Pompei, G. Gandini, M. Claustres, X. Estivill, P.F. Pignatti, and G. Modiano. 2000. A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Human genetics*. 106:172-178.
- Bonev, B., P. Stanley, and N. Papalopulu. 2012. MicroRNA-9 Modulates Hes1 ultradian oscillations by forming a double-negative feedback loop. *Cell reports*. 2:10-18.
- Bonnafe, E., M. Touka, A. AitLounis, D. Baas, E. Barras, C. UCLA, A. Moreau, F. Flamant, R. Dubruille, P. Couble, J. Collignon, B. Durand, and W. Reith. 2004. The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol Cell Biol*. 24:4417-4427.
- Bornens, M., M. Paintrand, J. Berges, M.C. Marty, and E. Karsenti. 1987. Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell motility and the cytoskeleton*. 8:238-249.
- Borok, Z., J.M. Liebler, R.L. Lubman, M.J. Foster, B. Zhou, X. Li, S.M. Zabski, K.J. Kim, and E.D. Crandall. 2002. Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 282:L599-608.
- Borradori, L., and A. Sonnenberg. 1996. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Current opinion in cell biology*. 8:647-656.
- Borthwick, D.W., M. Shahbazian, Q.T. Krantz, J.R. Dorin, and S.H. Randell. 2001. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 24:662-670.
- Bosch Grau, M., G. Gonzalez Curto, C. Rocha, M.M. Magiera, P. Marques Sousa, T. Giordano, N. Spassky, and C. Janke. 2013. Tubulin glycylation and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *The Journal of cell biology*. 202:441-451.
- Bou Kheir, T., E. Futoma-Kazmierczak, A. Jacobsen, A. Krogh, L. Bardram, C. Hother, K. Gronbaek, B. Federspiel, A.H. Lund, and L. Friis-Hansen. 2011. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular cancer*. 10:29.
- Boucher, R.C. 1994. The genetics of cystic fibrosis: a paradigm for uncovering new drug targets. *Current opinion in biotechnology*. 5:639-642.
- Boucher, R.C. 1999. Status of gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *The Journal of clinical investigation*. 103:441-445.
- Boucher, R.C. 2003. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 445:495-498.
- Boucher, R.C. 2007a. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine*. 58:157-170.
- Boucher, R.C. 2007b. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends in molecular medicine*. 13:231-240.
- Bowes, D., A.E. Clark, and B. Corrin. 1981. Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax*. 36:108-115.
- Boyle, A.P., L. Song, B.K. Lee, D. London, D. Keefe, E. Birney, V.R. Iyer, G.E. Crawford, and T.S. Furey. 2011. High-resolution genome-wide in vivo footprinting of diverse transcription factors in human cells. *Genome research*. 21:456-464.
- Bre, M.H., V. Redeker, M. Quibell, J. Darmanaden-Delorme, C. Bressac, J. Cosson, P. Huitorel, J.M. Schmitter, J. Rossler, T. Johnson, A. Adoutte, and N. Levilliers. 1996. Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *Journal of cell science*. 109 (Pt 4):727-738.
- Breeze, R.G., and E.B. Wheeldon. 1977. The cells of the pulmonary airways. *The American review of respiratory disease*. 116:705-777.

- Bretscher, A. 1983. Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *The Journal of cell biology*. 97:425-432.
- Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:586-599.
- Breuer, R., G. Zajicek, T.G. Christensen, E.C. Lucey, and G.L. Snider. 1990. Cell kinetics of normal adult hamster bronchial epithelium in the steady state. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2:51-58.
- Brodersen, P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y.Y. Yamamoto, L. Sieburth, and O. Voinnet. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*. 320:1185-1190.
- Broers, J.L., L. de Leij, M.K. Rot, A. ter Haar, E.B. Lane, I.M. Leigh, S.S. Wagenaar, G.P. Vooijs, and F.C. Ramaekers. 1989. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human lung tissues. *Differentiation; research in biological diversity*. 40:119-128.
- Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J.R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R.A. Black, and A. Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular cell*. 5:207-216.
- Bruckner, K., L. Perez, H. Clausen, and S. Cohen. 2000. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*. 406:411-415.
- Busuttil, A., I.A. More, and D. McSeveney. 1977. A reappraisal of the ultrastructure of the human respiratory nasal mucosa. *J Anat*. 124:445-458.
- Button, B., L.H. Cai, C. Ehre, M. Kesimer, D.B. Hill, J.K. Sheehan, R.C. Boucher, and M. Rubinstein. 2012. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science*. 337:937-941.
- Calarco-Gillam, P.D., M.C. Siebert, R. Hubble, T. Mitchison, and M. Kirschner. 1983. Centrosome development in early mouse embryos as defined by an autoantibody against pericentriolar material. *Cell*. 35:621-629.
- Calderwood, D.A., A. Huttenlocher, W.B. Kiosses, D.M. Rose, D.G. Woodside, M.A. Schwartz, and M.H. Ginsberg. 2001. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nature cell biology*. 3:1060-1068.
- Capuano, M., L. Iaffaldano, N. Tinto, D. Montanaro, V. Capobianco, V. Izzo, F. Tucci, G. Troncone, L. Greco, and L. Sacchetti. 2011. MicroRNA-449a overexpression, reduced NOTCH1 signals and scarce goblet cells characterize the small intestine of celiac patients. *PloS one*. 6:e29094.
- Carvalho-Santos, Z., J. Azimzadeh, J.B. Pereira-Leal, and M. Bettencourt-Dias. 2011. Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *The Journal of cell biology*. 194:165-175.
- Castell, J.V., M.T. Donato, and M.J. Gomez-Lechon. 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 57 Suppl 1:189-204.
- Castranova, V., J. Rabovsky, J.H. Tucker, and P.R. Miles. 1988. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicology and applied pharmacology*. 93:472-483.
- Cavalier-Smith, T. 1978. The evolutionary origin and phylogeny of microtubules, mitotic spindles and eukaryote flagella. *Bio Systems*. 10:93-114.
- Cavalier-Smith, T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 52:297-354.
- Caygill, E.E., and L.A. Johnston. 2008. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the let-7 and miR-125 heterochronic microRNAs. *Current biology : CB*. 18:943-950.
- Chalfie, M., H.R. Horvitz, and J.E. Sulston. 1981. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. 24:59-69.
- Chambers, L.A., B.M. Rollins, and R. Tarran. 2007. Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respiratory physiology & neurobiology*. 159:256-270.
- Chang, C., and R.M. Harland. 2007. Neural induction requires continued suppression of both Smad1 and Smad2 signals during gastrulation. *Development*. 134:3861-3872.

- Chapman, S., X. Liu, C. Meyers, R. Schlegel, and A.A. McBride. 2010. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *The Journal of clinical investigation*. 120:2619-2626.
- Chekulaeva, M., H. Mathys, J.T. Zipprich, J. Attig, M. Colic, R. Parker, and W. Filipowicz. 2011. miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nature structural & molecular biology*. 18:1218-1226.
- Chekulaeva, M., R. Parker, and W. Filipowicz. 2010. The GW/WG repeats of Drosophila GW182 function as effector motifs for miRNA-mediated repression. *Nucleic acids research*. 38:6673-6683.
- Chen, C.Y., D. Zheng, Z. Xia, and A.B. Shyu. 2009. Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nature structural & molecular biology*. 16:1160-1166.
- Chen, J., H.J. Knowles, J.L. Hebert, and B.P. Hackett. 1998. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *The Journal of clinical investigation*. 102:1077-1082.
- Chendrimada, T.P., K.J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R.I. Gregory, S.A. Liebhaber, A.E. Pasquinelli, and R. Shiekhattar. 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 447:823-828.
- Chendrimada, T.P., R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, and R. Shiekhattar. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 436:740-744.
- Cherfils, J., and M. Zeghouf. 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 93:269-309.
- Chertov, O., D.F. Michiel, L. Xu, J.M. Wang, K. Tani, W.J. Murphy, D.L. Longo, D.D. Taub, and J.J. Oppenheim. 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. 271:2935-2940.
- Chi, S.W., J.B. Zang, A. Mele, and R.B. Darnell. 2009. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*. 460:479-486.
- Chichinadze, K., A. Lazarashvili, and J. Tkemaladze. 2013. RNA in centrosomes: structure and possible functions. *Protoplasma*. 250:397-405.
- Christensen, T.G., G.C. Blanchard, G. Nolley, and J.A. Hayes. 1981. Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in the lower respiratory tract of the guinea pig. *Cell and tissue research*. 214:407-415.
- Christensen, T.G., and J.A. Hayes. 1982. Endogenous peroxidase in the conducting airways of hamsters: morphologic evidence of synthesis and secretion. *The American review of respiratory disease*. 125:341-346.
- Christodoulou, F., F. Raible, R. Tomer, O. Simakov, K. Trachana, S. Klaus, H. Snyman, G.J. Hannon, P. Bork, and D. Arendt. 2010. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature*. 463:1084-1088.
- Chung, T.K., T.S. Lau, T.H. Cheung, S.F. Yim, K.W. Lo, N.S. Siu, L.K. Chan, M.Y. Yu, J. Kwong, G. Doran, L.M. Barroilhet, A.S. Ng, R.R. Wong, V.W. Wang, S.C. Mok, D.I. Smith, R.S. Berkowitz, and Y.F. Wong. 2012. Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 130:1036-1045.
- Clarke, L.L., B.R. Grubb, S.E. Gabriel, O. Smithies, B.H. Koller, and R.C. Boucher. 1992. Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*. 257:1125-1128.
- Cohn, L. 2006. Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. *The Journal of clinical investigation*. 116:306-308.
- Cole, A.M., H.I. Liao, O. Stuchlik, J. Tilan, J. Pohl, and T. Ganz. 2002. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol*. 169:6985-6991.

- Colledge, W.H., B.S. Abella, K.W. Southern, R. Ratcliff, C. Jiang, S.H. Cheng, L.J. MacVinish, J.R. Anderson, A.W. Cuthbert, and M.J. Evans. 1995. Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nature genetics*. 10:445-452.
- Cooper, M.S., and L.A. D'Amico. 1996. A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Developmental biology*. 180:184-198.
- Crapo, J.D., B.E. Barry, P. Gehr, M. Bachofen, and E.R. Weibel. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *The American review of respiratory disease*. 126:332-337.
- Crespin, S., M. Bacchetta, S. Huang, T. Dudez, L. Wiszniewski, and M. Chanson. 2011. Approaches to study differentiation and repair of human airway epithelial cells. *Methods in molecular biology*. 742:173-185.
- Crystal, R.G. 1997. *The Lung: Scientific Foundations*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Cutz, E., J.E. Gillan, and A.C. Bryan. 1985. Neuroendocrine cells in the developing human lung: morphologic and functional considerations. *Pediatric pulmonology*. 1:S21-29.
- Dajani, R., Y. Zhang, P.J. Taft, S.M. Travis, T.D. Starner, A. Olsen, J. Zabner, M.J. Welsh, and J.F. Engelhardt. 2005. Lysozyme secretion by submucosal glands protects the airway from bacterial infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 32:548-552.
- Danesh, S.M., A. Villasenor, D. Chong, C. Soukup, and O. Cleaver. 2009. BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene expression patterns : GEP*. 9:255-265.
- Daniely, Y., G. Liao, D. Dixon, R.I. Linnoila, A. Lori, S.H. Randell, M. Oren, and A.M. Jetten. 2004. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:C171-181.
- Davis, K.A., and E.A. Cowley. 2006. Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 451:631-641.
- Dawson, D.C., S.S. Smith, and M.K. Mansoura. 1999. CFTR: mechanism of anion conduction. *Physiol Rev*. 79:S47-75.
- de Celis, J.F., and S. Bray. 1997. Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development*. 124:3241-3251.
- de Jong, E.M., H. Douben, B.H. Eussen, J.F. Felix, M.W. Wessels, P.J. Poddighe, P.G. Nikkels, R.R. de Krijger, D. Tibboel, and A. de Klein. 2010. 5q11.2 deletion in a patient with tracheal agenesis. *European journal of human genetics : EJHG*. 18:1265-1268.
- De Robertis, E.M., O. Wessely, M. Oelgeschlager, B. Brizuela, E. Pera, J. Larrain, J. Abreu, and D. Bachiller. 2001. Molecular mechanisms of cell-cell signaling by the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol*. 45:189-197.
- De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 398:518-522.
- De Water, R., L.N. Willems, G.N. Van Muijen, C. Franken, J.A. Fransen, J.H. Dijkman, and J.A. Kramps. 1986. Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *The American review of respiratory disease*. 133:882-890.
- Deblandre, G.A., D.A. Wettstein, N. Koyano-Nakagawa, and C. Kintner. 1999. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development*. 126:4715-4728.
- Del Bigio, M.R. 1995. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*. 14:1-13.
- Delaune, E., P. Lemaire, and L. Kodjabachian. 2005. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*. 132:299-310.

- Dellavalle, R.P., T.B. Egbert, A. Marchbank, L.J. Su, L.A. Lee, and P. Walsh. 2001. CUSP/p63 expression in rat and human tissues. *J Dermatol Sci.* 27:82-87.
- Desai, L.P., A.M. Aryal, B. Ceacareanu, A. Hassid, and C.M. Waters. 2004. RhoA and Rac1 are both required for efficient wound closure of airway epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 287:L1134-1144.
- Diaz-Benjumea, F.J., and S.M. Cohen. 1995. Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development.* 121:4215-4225.
- Didon, L., R.K. Zwick, I.W. Chao, M.S. Walters, R. Wang, N.R. Hackett, and R.G. Crystal. 2013. RFX3 Modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir Res.* 14:70.
- Dippell, R.V. 1976. Effects of nuclease and protease digestion on the ultrastructure of *Paramecium* basal bodies. *The Journal of cell biology.* 69:622-637.
- Dobbelaere, J., F. Josue, S. Suijkerbuijk, B. Baum, N. Tapon, and J. Raff. 2008. A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in *Drosophila*. *PLoS biology.* 6:e224.
- Dobbs, L.G., R. Gonzalez, M.A. Matthay, E.P. Carter, L. Allen, and A.S. Verkman. 1998. Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:2991-2996.
- Doherty, D., G. Feger, S. Younger-Shepherd, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1996. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes & development.* 10:421-434.
- Donaldson, S.H., T.E. Corcoran, B.L. Laube, and W.D. Bennett. 2007. Mucociliary clearance as an outcome measure for cystic fibrosis clinical research. *Proc Am Thorac Soc.* 4:399-405.
- Donnelly, G.M., D.G. Haack, and C.S. Heird. 1982. Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. *Cell and tissue kinetics.* 15:119-130.
- Dorin, J.R., P. Dickinson, E.W. Alton, S.N. Smith, D.M. Geddes, B.J. Stevenson, W.L. Kimber, S. Fleming, A.R. Clarke, M.L. Hooper, and et al. 1992a. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature.* 359:211-215.
- Dorin, J.R., P. Dickinson, E. Emslie, A.R. Clarke, L. Dobbie, M.L. Hooper, S. Halford, B.J. Wainwright, and D.J. Porteous. 1992b. Successful targeting of the mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonal stem cells. *Transgenic research.* 1:101-105.
- Drummond, I. 2003. The skate weighs in on kidney regeneration. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 14:1704-1705.
- Dubaissi, E., and N. Papalopulu. 2011. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Dis Model Mech.* 4:179-192.
- Dupuit, F., D. Gaillard, J. Hinnrasky, E. Mongodin, S. de Bentzmann, E. Copreni, and E. Puchelle. 2000. Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 278:L165-176.
- Duursma, A.M., M. Kedde, M. Schrier, C. le Sage, and R. Agami. 2008. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna.* 14:872-877.
- Eipper, B.A. 1972. Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 69:2283-2287.
- El-Shami, M., D. Pontier, S. Lahmy, L. Braun, C. Picart, D. Vega, M.A. Hakimi, S.E. Jacobsen, R. Cooke, and T. Lagrange. 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & development.* 21:2539-2544.
- El Zein, L., A. Ait-Lounis, L. Morle, J. Thomas, B. Chhin, N. Spassky, W. Reith, and B. Durand. 2009. RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies. *Journal of cell science.* 122:3180-3189.

- Elkayam, E., C.D. Kuhn, A. Tocilj, A.D. Haase, E.M. Greene, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor. 2012. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*. 150:100-110.
- Ellefsen, P., and M. Tos. 1972. Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae. *Anatomischer Anzeiger*. 130:501-520.
- Emura, M. 1997. Stem cells of the respiratory epithelium and their in vitro cultivation. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*. 33:3-14.
- Essner, J.J., J.D. Amack, M.K. Nyholm, E.B. Harris, and H.J. Yost. 2005. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*. 132:1247-1260.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, and E. Izaurralde. 2008. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*. 15:346-353.
- Evans, M.J., R.A. Cox, A.S. Burke, and P.C. Moller. 1992. Differentiation of anchoring junctions in tracheal basal cells in the growing rat. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 6:153-157.
- Evans, M.J., R.A. Cox, S.G. Shami, and C.G. Plopper. 1990. Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 3:341-347.
- Evans, M.J., R.A. Cox, S.G. Shami, B. Wilson, and C.G. Plopper. 1989. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1:463-469.
- Evans, M.J., and P.C. Moller. 1991. Biology of airway basal cells. *Experimental lung research*. 17:513-531.
- Evans, M.J., L.S. Van Winkle, M.V. Fanucchi, and C.G. Plopper. 2001. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Experimental lung research*. 27:401-415.
- Ezratty, E.J., N. Stokes, S. Chai, A.S. Shah, S.E. Williams, and E. Fuchs. 2011. A role for the primary cilium in Notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell*. 145:1129-1141.
- Fagotto, F., K. Guger, and B.M. Gumbiner. 1997. Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. *Development*. 124:453-460.
- Falk, M.M. 2000. Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *Journal of cell science*. 113 (Pt 22):4109-4120.
- Fang, X., N. Fukuda, P. Barbry, C. Sartori, A.S. Verkman, and M.A. Matthay. 2002. Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *The Journal of general physiology*. 119:199-207.
- Fawcett, D.W. 1981. The cell. W. B. Saunders Co.
- Fehon, R.G., P.J. Kooh, I. Rebay, C.L. Regan, T. Xu, M.A. Muskavitch, and S. Artavanis-Tsakonas. 1990. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell*. 61:523-534.
- Fehrenbach, H., A. Schmiedl, T. Wahlers, S.W. Hirt, F. Brasch, D. Riemann, and J. Richter. 1995. Morphometric characterisation of the fine structure of human type II pneumocytes. *The Anatomical record*. 243:49-62.
- Feng, M., and Q. Yu. 2010. miR-449 regulates CDK-Rb-E2F1 through an auto-regulatory feedback circuit. *Cell cycle*. 9:213-214.
- Ferreira, P.A. 2005. Insights into X-linked retinitis pigmentosa type 3, allied diseases and underlying pathomechanisms. *Human molecular genetics*. 14 Spec No. 2:R259-267.
- Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*. 9:102-114.
- Finkbeiner, W.E., L.T. Zlock, I. Mehdi, and J.H. Widdicombe. 2010. Cultures of human tracheal gland cells of mucous or serous phenotype. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*. 46:450-456.

- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811.
- Francis, R.J., B. Chatterjee, N.T. Loges, H. Zentgraf, H. Omran, and C.W. Lo. 2009. Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 296:L1067-1075.
- Franken, C., J.A. Kramps, C.J. Meyer, and J.H. Dijkman. 1980. Localization of a low molecular weight protease inhibitor in the respiratory tract. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 16 Suppl:231-236.
- Friedman, R.C., K.K. Farh, C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 19:92-105.
- Gadsby, D.C., and A.C. Nairn. 1999a. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev*. 79:S77-S107.
- Gadsby, D.C., and A.C. Nairn. 1999b. Regulation of CFTR Cl⁻ ion channels by phosphorylation and dephosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 33:79-106.
- Gaertig, J., M.A. Cruz, J. Bowen, L. Gu, D.G. Pennock, and M.A. Gorovsky. 1995. Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of cell biology*. 129:1301-1310.
- Gaillard, D., S. Ruocco, A. Lallemand, W. Dalemans, J. Hinnrasky, and E. Puchelle. 1994. Immunohistochemical localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human fetal airway and digestive mucosa. *Pediatric research*. 36:137-143.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*. 3:710-720.
- Garcia-Mata, R., E. Boulter, and K. Burrige. 2011. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:493-504.
- Garcia-Verdugo, J.M., S. Ferron, N. Flames, L. Collado, E. Desfilis, and E. Font. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain research bulletin*. 57:765-775.
- Garrod, D.R. 1993. Desmosomes and hemidesmosomes. *Current opinion in cell biology*. 5:30-40.
- Gauthier, F., U. Fryksmark, K. Ohlsson, and J.G. Bieth. 1982. Kinetics of the inhibition of leukocyte elastase by the bronchial inhibitor. *Biochimica et biophysica acta*. 700:178-183.
- Gazave, E., P. Lapebie, G.S. Richards, F. Brunet, A.V. Ereskovsky, B.M. Degnan, C. Borchellini, M. Vervoort, and E. Renard. 2009. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC evolutionary biology*. 9:249.
- Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis. 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*. 137:32-45.
- Gerson, C., J. Sabater, M. Scuri, A. Torbati, R. Coffey, J.W. Abraham, I. Lauredo, R. Forteza, A. Wanner, M. Salathe, W.M. Abraham, and G.E. Conner. 2000. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22:665-671.
- Gherman, A., E.E. Davis, and N. Katsanis. 2006. The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nature genetics*. 38:961-962.
- Ghossoub, R., A. Molla-Herman, P. Bastin, and A. Benmerah. 2011. The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 103:131-144.
- Gibbons, I.R. 1963. Studies on the Protein Components of Cilia from *Tetrahymena Pyriformis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 50:1002-1010.
- Gilljam, H., A.M. Motakefi, B. Robertson, and B. Strandvik. 1987. Ultrastructure of the bronchial epithelium in adult patients with cystic fibrosis. *European journal of respiratory diseases*. 71:187-194.
- Giovannini-Chami, L., B. Marcet, C. Moreilhon, B. Chevalier, M.I. Illie, K. Lebrigand, K. Robbe-Sermesant, T. Bourrier, J.F. Michiels, B. Mari, D. Crenesse, P. Hofman, J. de Blic, L. Castillo, M.

- Albertini, and P. Barbry. 2012. Distinct epithelial gene expression phenotypes in childhood respiratory allergy. *Eur Respir J.* 39:1197-1205.
- Goetz, S.C., and K.V. Anderson. 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews. Genetics.* 11:331-344.
- Gomperts, B.N., X. Gong-Cooper, and B.P. Hackett. 2004. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *Journal of cell science.* 117:1329-1337.
- Goodman, M.R., D.W. Link, W.R. Brown, and P.K. Nakane. 1981. Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium. *The American review of respiratory disease.* 123:115-119.
- Greco, S., M. De Simone, C. Colussi, G. Zaccagnini, P. Fasanaro, M. Pescatori, R. Cardani, R. Perbellini, E. Isaia, P. Sale, G. Meola, M.C. Capogrossi, C. Gaetano, and F. Martelli. 2009. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 23:3335-3346.
- Greenwood, M.F., and P. Holland. 1972. The mammalian respiratory tract surface. A scanning electron microscopic study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 27:296-304.
- Greer, K., H. Maruta, S.W. L'Hernault, and J.L. Rosenbaum. 1985. Alpha-tubulin acetylase activity in isolated Chlamydomonas flagella. *The Journal of cell biology.* 101:2081-2084.
- Gregory, R.I., K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432:235-240.
- Griffiths, G.S., M. Grundl, J.S. Allen, 3rd, and M.L. Matter. 2011. R-Ras interacts with filamin a to maintain endothelial barrier function. *Journal of cellular physiology.* 226:2287-2296.
- Grimson, A., K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim, and D.P. Bartel. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell.* 27:91-105.
- Grosso, S., J. Doyen, S.K. Parks, T. Bertero, A. Paye, B. Cardinaud, P. Gounon, S. Lacas-Gervais, A. Noel, J. Pouyssegur, P. Barbry, N.M. Mazure, and B. Mari. 2013. MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines. *Cell death & disease.* 4:e544.
- Grubb, B.R., and R.C. Boucher. 1999. Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev.* 79:S193-214.
- Guichard, P., D. Chretien, S. Marco, and A.M. Tassin. 2010. Procentriole assembly revealed by cryo-electron tomography. *The EMBO journal.* 29:1565-1572.
- Guirao, B., A. Meunier, S. Mortaud, A. Aguilar, J.M. Corsi, L. Strehl, Y. Hirota, A. Desoeuvre, C. Boutin, Y.G. Han, Z. Mirzadeh, H. Cremer, M. Montcouquiol, K. Sawamoto, and N. Spassky. 2010. Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nature cell biology.* 12:341-350.
- Gumbiner, B.M. 1993. Breaking through the tight junction barrier. *The Journal of cell biology.* 123:1631-1633.
- Guo, H., N.T. Ingolia, J.S. Weissman, and D.P. Bartel. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 466:835-840.
- Guseh, J.S., S.A. Bores, B.Z. Stanger, Q. Zhou, W.J. Anderson, D.A. Melton, and J. Rajagopal. 2009. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development.* 136:1751-1759.
- Habas, R., Y. Kato, and X. He. 2001. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell.* 107:843-854.
- Habedanck, R., Y.D. Stierhof, C.J. Wilkinson, and E.A. Nigg. 2005. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nature cell biology.* 7:1140-1146.
- Hackett, N.R., R. Shaykhiev, M.S. Walters, R. Wang, R.K. Zwick, B. Ferris, B. Witover, J. Salit, and R.G. Crystal. 2011. The human airway epithelial basal cell transcriptome. *PloS one.* 6:e18378.

- Haddon, C., and J. Lewis. 1996. Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of comparative neurology*. 365:113-128.
- Hafner, M., M. Landthaler, L. Burger, M. Khorshid, J. Hausser, P. Berninger, A. Rothballer, M. Ascano, Jr., A.C. Jungkamp, M. Munschauer, A. Ulrich, G.S. Wardle, S. Dewell, M. Zavolan, and T. Tuschl. 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*. 141:129-141.
- Hagiwara, H., N. Ohwada, T. Aoki, T. Suzuki, and K. Takata. 2008. The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa. *Medical molecular morphology*. 41:193-198.
- Haines, N., and K.D. Irvine. 2003. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:786-797.
- Hajj, R. 2006. Régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain et mucoviscidose et identification des cellules progénitrices épithéliales *In* U.F.R. DE MEDECINE. UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE.
- Hajj, R., T. Baranek, R. Le Naour, P. Lesimple, E. Puchelle, and C. Coraux. 2007. Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells*. 25:139-148.
- Halappanavar, S., P. Jackson, A. Williams, K.A. Jensen, K.S. Hougaard, U. Vogel, C.L. Yauk, and H. Wallin. 2011. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environmental and molecular mutagenesis*. 52:425-439.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*. 40:1378-1382.
- Hall, R.A., L.S. Ostedgaard, R.T. Premont, J.T. Blitzler, N. Rahman, M.J. Welsh, and R.J. Lefkowitz. 1998. A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:8496-8501.
- Han, J., Y. Lee, K.H. Yeom, J.W. Nam, I. Heo, J.K. Rhee, S.Y. Sohn, Y. Cho, B.T. Zhang, and V.N. Kim. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 125:887-901.
- Hansell, M.M., and R.L. Moretti. 1969. Ultrastructure of the mouse tracheal epithelium. *J Morphol*. 128:159-169.
- Harkema, J.R. 1991. Comparative aspects of nasal airway anatomy: relevance to inhalation toxicology. *Toxicologic pathology*. 19:321-336.
- Harlow, P., and M. Nemer. 1987. Coordinate and selective beta-tubulin gene expression associated with cilium formation in sea urchin embryos. *Genes & development*. 1:1293-1304.
- Harris, K.S., Z. Zhang, M.T. McManus, B.D. Harfe, and X. Sun. 2006. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:2208-2213.
- Harwig, S.S., T. Ganz, and R.I. Lehrer. 1994. Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing. *Methods in enzymology*. 236:160-172.
- Hasty, P., W.K. O'Neal, K.Q. Liu, A.P. Morris, Z. Bebok, G.B. Shumyatsky, T. Jilling, E.J. Sorscher, A. Bradley, and A.L. Beaudet. 1995. Severe phenotype in mice with termination mutation in exon 2 of cystic fibrosis gene. *Somatic cell and molecular genetics*. 21:177-187.
- Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido, and T. Takahashi. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*. 65:9628-9632.
- Hayes, J.M., S.K. Kim, P.B. Abitua, T.J. Park, E.R. Herrington, A. Kitayama, M.W. Grow, N. Ueno, and J.B. Wallingford. 2007. Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Developmental biology*. 312:115-130.
- He, L., and G.J. Hannon. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*. 5:522-531.

- Hedges, S.B. 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nature reviews. Genetics*. 3:838-849.
- Heijerman, H. 2005. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 4 Suppl 2:3-5.
- Heitzler, P., and P. Simpson. 1991. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell*. 64:1083-1092.
- Hertel, J., M. Lindemeyer, K. Missal, C. Fried, A. Tanzer, C. Flamm, I.L. Hofacker, P.F. Stadler, and a. Students of Bioinformatics Computer Labs. 2006. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. *BMC genomics*. 7:25.
- Hinchcliffe, E.H., and G. Sluder. 2001. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes & development*. 15:1167-1181.
- Hinnrasky, J., M. Chevillard, and E. Puchelle. 1990. Immunocytochemical demonstration of quantitative differences in the distribution of lysozyme in human airway secretory granule phenotypes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 68:239-243.
- Hirokawa, N., Y. Tanaka, Y. Okada, and S. Takeda. 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*. 125:33-45.
- Hodges, M.E., N. Scheumann, B. Wickstead, J.A. Langdale, and K. Gull. 2010. Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *Journal of cell science*. 123:1407-1413.
- Hodges, M.E., B. Wickstead, K. Gull, and J.A. Langdale. 2011. Conservation of ciliary proteins in plants with no cilia. *BMC plant biology*. 11:185.
- Hodkinson, P.S., P.A. Elliott, Y. Lad, B.J. McHugh, A.C. MacKinnon, C. Haslett, and T. Sethi. 2007. Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras. *The Journal of biological chemistry*. 282:28991-29001.
- Hoesel, B., Z. Bhujabal, G.K. Przemeck, A. Kurz-Drexler, D.M. Weisenhorn, M.H. Angelis, and J. Beckers. 2010. Combination of in silico and in situ hybridisation approaches to identify potential Dll1 associated miRNAs during mouse embryogenesis. *Gene expression patterns : GEP*. 10:265-273.
- Hoey, J.G., and R.H. Gavin. 1992. Localization of actin in the Tetrahymena basal body-cage complex. *Journal of cell science*. 103 (Pt 3):629-641.
- Hoffman, R.M., W.D. Claypool, S.L. Katyal, G. Singh, R.M. Rogers, and J.H. Dauber. 1987. Augmentation of rat alveolar macrophage migration by surfactant protein. *The American review of respiratory disease*. 135:1358-1362.
- Holland, A.J., D. Fachinetti, S. Da Cruz, Q. Zhu, B. Vitre, M. Lince-Faria, D. Chen, N. Parish, I.M. Verma, M. Bettencourt-Dias, and D.W. Cleveland. 2012. Polo-like kinase 4 controls centriole duplication but does not directly regulate cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 23:1838-1845.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C.C. Harris. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*. 253:49-53.
- Hong, K.U., S.D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B.R. Stripp. 2004a. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol*. 164:577-588.
- Hong, K.U., S.D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B.R. Stripp. 2004b. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 286:L643-649.
- Horani, A., S.L. Brody, T.W. Ferkol, D. Shoseyov, M.G. Wasserman, A. Ta-Shma, K.S. Wilson, P.V. Bayly, I. Amirav, M. Cohen-Cymbereknoh, S.K. Dutcher, O. Elpeleg, and E. Kerem. 2013. CCDC65 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Normal Ultrastructure and Hyperkinetic Cilia. *PloS one*. 8:e72299.
- Hovenberg, H.W., J.R. Davies, A. Herrmann, C.J. Linden, and I. Carlstedt. 1996. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconjugate journal*. 13:839-847.

- Hu, Q., and W.J. Nelson. 2011. Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton*. 68:313-324.
- Huang, B., Z. Ramanis, and D.J. Luck. 1982. Suppressor mutations in *Chlamydomonas* reveal a regulatory mechanism for Flagellar function. *Cell*. 28:115-124.
- Huang, T., Y. You, M.S. Spoor, E.J. Richer, V.V. Kudva, R.C. Paige, M.P. Seiler, J.M. Liebler, J. Zabner, C.G. Plopper, and S.L. Brody. 2003. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *Journal of cell science*. 116:4935-4945.
- Huntzinger, E., and E. Izaurralde. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews. Genetics*. 12:99-110.
- Ikegami, K., S. Sato, K. Nakamura, L.E. Ostrowski, and M. Setou. 2010. Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:10490-10495.
- Ikegami, K., and M. Setou. 2009. TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8. *FEBS letters*. 583:1957-1963.
- Iliopoulos, D., E.I. Bimpaki, M. Nesterova, and C.A. Stratakis. 2009. MicroRNA signature of primary pigmented nodular adrenocortical disease: clinical correlations and regulation of Wnt signaling. *Cancer research*. 69:3278-3282.
- Inglis, P.N., K.A. Boroevich, and M.R. Leroux. 2006. Piecing together a ciliome. *Trends in genetics : TIG*. 22:491-500.
- Irvine, K.D., and T.F. Vogt. 1997. Dorsal-ventral signaling in limb development. *Current opinion in cell biology*. 9:867-876.
- Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of cellular physiology*. 194:237-255.
- Jacquet, B.V., R. Salinas-Mondragon, H. Liang, B. Therit, J.D. Buie, M. Dykstra, K. Campbell, L.E. Ostrowski, S.L. Brody, and H.T. Ghashghaei. 2009. FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*. 136:4021-4031.
- Jain, R., J. Pan, J.A. Driscoll, J.W. Wisner, T. Huang, S.P. Gunsten, Y. You, and S.L. Brody. 2010. Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 43:731-739.
- Jakobsen, L., K. Vanselow, M. Skogs, Y. Toyoda, E. Lundberg, I. Poser, L.G. Falkenby, M. Bennetzen, J. Westendorf, E.A. Nigg, M. Uhlen, A.A. Hyman, and J.S. Andersen. 2011. Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *The EMBO journal*. 30:1520-1535.
- Jansen, R.P. 1978. Fallopian tube isthmus mucus and ovum transport. *Science*. 201:349-351.
- Jeffery, P.K. 1983. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *The American review of respiratory disease*. 128:S14-20.
- Jeffery, P.K., and D. Li. 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J*. 10:1655-1662.
- Jentsch, T.J., V. Stein, F. Weinreich, and A.A. Zdebik. 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*. 82:503-568.
- Jeon, H.S., S.Y. Lee, E.J. Lee, S.C. Yun, E.J. Cha, E. Choi, M.J. Na, J.Y. Park, J. Kang, and J.W. Son. 2012. Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer. *Lung cancer*. 76:171-176.
- Jesaitis, L.A., and D.A. Goodenough. 1994. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *The Journal of cell biology*. 124:949-961.
- Johansson, J., H. Jornvall, and T. Curstedt. 1992. Human surfactant polypeptide SP-B. Disulfide bridges, C-terminal end, and peptide analysis of the airway form. *FEBS letters*. 301:165-167.
- Johnson, M.D., J.H. Widdicombe, L. Allen, P. Barbry, and L.G. Dobbs. 2002. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I

- cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:1966-1971.
- Johnston, S.H., C. Rauskolb, R. Wilson, B. Prabhakaran, K.D. Irvine, and T.F. Vogt. 1997. A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development*. 124:2245-2254.
- Jorgensen, P.L., K.O. Hakansson, and S.J. Karlish. 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology*. 65:817-849.
- Jornot, L., E. Grouzmann, J.S. Lacroix, and T. Rochat. 2007. BDNF and DPP-IV in polyps and middle turbinates epithelial cells. *Rhinology*. 45:129-133.
- Jornot, L., J.S. Lacroix, and T. Rochat. 2008. Neuroendocrine cells of nasal mucosa are a cellular source of brain-derived neurotrophic factor. *Eur Respir J*. 32:769-774.
- Kamiya, R. 2002. Functional diversity of axonemal dyneins as studied in Chlamydomonas mutants. *International review of cytology*. 219:115-155.
- Kashat, M., L. Azzouz, S.H. Sarkar, D. Kong, Y. Li, and F.H. Sarkar. 2012. Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness. *American journal of translational research*. 4:432-442.
- Kauffman, S.L. 1980. Cell proliferation in the mammalian lung. *International review of experimental pathology*. 22:131-191.
- Kellenberger, E., A. Bolle, E. Boydelatour, R.H. Epstein, N.C. Franklin, N.K. Jerne, A. Reale Scafati, and J. Sechaud. 1965. Functions and Properties Related to the Tail Fibers of Bacteriophage T4. *Virology*. 26:419-440.
- Keller, L.R., J.A. Schloss, C.D. Silflow, and J.L. Rosenbaum. 1984. Transcription of alpha- and beta-tubulin genes in vitro in isolated Chlamydomonas reinhardi nuclei. *The Journal of cell biology*. 98:1138-1143.
- Kent, G., R. Iles, C.E. Bear, L.J. Huan, U. Griesenbach, C. McKerlie, H. Frndova, C. Ackerley, D. Gosselin, D. Radzioch, H. O'Brodovich, L.C. Tsui, M. Buchwald, and A.K. Tanswell. 1997. Lung disease in mice with cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 100:3060-3069.
- Kerem, B., J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Markiewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L.C. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 245:1073-1080.
- Kesimer, M., C. Ehre, K.A. Burns, C.W. Davis, J.K. Sheehan, and R.J. Pickles. 2013. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol*. 6:379-392.
- Kesimer, M., and J.K. Sheehan. 2012. Mass spectrometric analysis of mucin core proteins. *Methods in molecular biology*. 842:67-79.
- Khodjakov, A., C.L. Rieder, G. Sluder, G. Cassels, O. Sibon, and C.L. Wang. 2002. De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *The Journal of cell biology*. 158:1171-1181.
- Kim, S.K., A. Shindo, T.J. Park, E.C. Oh, S. Ghosh, R.S. Gray, R.A. Lewis, C.A. Johnson, T. Attie-Bittach, N. Katsanis, and J.B. Wallingford. 2010. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science*. 329:1337-1340.
- King, M., A. Gilboa, F.A. Meyer, and A. Silberberg. 1974. On the transport of mucus and its rheologic simulants in ciliated systems. *The American review of respiratory disease*. 110:740-745.
- Kingsley, E.P., X.Y. Chan, Y. Duan, and J.D. Lambert. 2007. Widespread RNA segregation in a spiralian embryo. *Evol Dev*. 9:527-539.
- Kiriakidou, M., G.S. Tan, S. Lamprinaki, M. De Planell-Saguer, P.T. Nelson, and Z. Mourelatos. 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*. 129:1141-1151.
- Kishimoto, N., and K. Sawamoto. 2012. Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation; research in biological diversity*. 83:S86-90.

- Kitagawa, D., G. Kohlmaier, D. Keller, P. Strnad, F.R. Balestra, I. Fluckiger, and P. Gonczy. 2011. Spindle positioning in human cells relies on proper centriole formation and on the microcephaly proteins CPAP and STIL. *Journal of cell science*. 124:3884-3893.
- Kleylein-Sohn, J., J. Westendorf, M. Le Clech, R. Habedanck, Y.D. Stierhof, and E.A. Nigg. 2007. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Developmental cell*. 13:190-202.
- Klinger, J.D., B. Tandler, C.M. Liedtke, and T.F. Boat. 1984. Proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* evoke mucin release by tracheal epithelium. *The Journal of clinical investigation*. 74:1669-1678.
- Knowles, M.R., and R.C. Boucher. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of clinical investigation*. 109:571-577.
- Kochanski, R.S., and G.G. Borisy. 1990. Mode of centriole duplication and distribution. *The Journal of cell biology*. 110:1599-1605.
- Koefoed-Johnsen, V., and H.H. Ussing. 1958. The nature of the frog skin potential. *Acta physiologica Scandinavica*. 42:298-308.
- Komatsu, Y., V. Kaartinen, and Y. Mishina. 2011. Cell cycle arrest in node cells governs ciliogenesis at the node to break left-right symmetry. *Development*. 138:3915-3920.
- Konstan, M.W., P.W. Cheng, and T.F. Boat. 1982. A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium. *Experimental lung research*. 3:175-181.
- Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 137:216-233.
- Kozminski, K.G., K.A. Johnson, P. Forscher, and J.L. Rosenbaum. 1993. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:5519-5523.
- Kramer-Zucker, A.G., F. Olale, C.J. Haycraft, B.K. Yoder, A.F. Schier, and I.A. Drummond. 2005. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*. 132:1907-1921.
- Kreda, S.M., C.W. Davis, and M.C. Rose. 2012. CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2:a009589.
- Kretzschmar, M., and J. Massague. 1998. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 8:103-111.
- Kubo, T., H.A. Yanagisawa, T. Yagi, M. Hirano, and R. Kamiya. 2010. Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins. *Current biology : CB*. 20:441-445.
- Kunzelmann, K., and M. Mall. 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*. 82:245-289.
- Kunzelmann, K., and R. Schreiber. 1999. CFTR, a regulator of channels. *The Journal of membrane biology*. 168:1-8.
- Kuriyama, R., Y. Terada, K.S. Lee, and C.L. Wang. 2007. Centrosome replication in hydroxyurea-arrested CHO cells expressing GFP-tagged centrin2. *Journal of cell science*. 120:2444-2453.
- L'Hernault, S.W., and J.L. Rosenbaum. 1985. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry*. 24:473-478.
- Lamb, D., and L. Reid. 1970. Histochemical and autoradiographic investigation of the serous cells of the human bronchial glands. *The Journal of pathology*. 100:127-138.
- Lanet, E., E. Delannoy, R. Sormani, M. Floris, P. Brodersen, P. Crete, O. Voinnet, and C. Robaglia. 2009. Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *The Plant cell*. 21:1762-1768.
- Latta, H., A.B. Maunsbach, and S.C. Madden. 1961. Cilia in different segments of the rat nephron. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 11:248-252.
- Le Brigand, K., K. Robbe-Sermesant, B. Mari, and P. Barbry. 2010. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics*. 26:3131-3132.

- Lecuyer, E., H. Yoshida, N. Parthasarathy, C. Alm, T. Babak, T. Cerovina, T.R. Hughes, P. Tomancak, and H.M. Krause. 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell*. 131:174-187.
- Lee, E.C., M.M. Lotz, G.D. Steele, Jr., and A.M. Mercurio. 1992. The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *The Journal of cell biology*. 117:671-678.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75:843-854.
- Leidel, S., M. Delattre, L. Cerutti, K. Baumer, and P. Gonczy. 2005. SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nature cell biology*. 7:115-125.
- Lenander-Lumikari, M., B. Mansson-Rahemtulla, and F. Rahemtulla. 1992. Lysozyme enhances the inhibitory effects of the peroxidase system on glucose metabolism of *Streptococcus mutans*. *Journal of dental research*. 71:484-490.
- LeSimple, P., I. van Seuning, M.P. Buisine, M.C. Copin, M. Hinz, W. Hoffmann, R. Hajj, S.L. Brody, C. Coraux, and E. Puchelle. 2007. Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 36:296-303.
- Levy, P.F., and M. Viljoen. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. 80:252-267.
- Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120:15-20.
- Lewis, B.P., I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, and C.B. Burge. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115:787-798.
- Li, K., S.R. Nagalla, and E.R. Spindel. 1994. A rhesus monkey model to characterize the role of gastrin-releasing peptide (GRP) in lung development. Evidence for stimulation of airway growth. *The Journal of clinical investigation*. 94:1605-1615.
- Li, S., J.J. Fernandez, W.F. Marshall, and D.A. Agard. 2012. Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryo-tomography. *The EMBO journal*. 31:552-562.
- Li, Y., F. Guessous, Y. Zhang, C. Dipierro, B. Kefas, E. Johnson, L. Marcinkiewicz, J. Jiang, Y. Yang, T.D. Schmittgen, B. Lopes, D. Schiff, B. Purow, and R. Abounader. 2009. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer research*. 69:7569-7576.
- Linnoila, R.I. 2006. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 86:425-444.
- Liu, M., F. Bi, X. Zhou, and Y. Zheng. 2012a. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends in cell biology*. 22:365-373.
- Liu, X., V. Ory, S. Chapman, H. Yuan, C. Albanese, B. Kallakury, O.A. Timofeeva, C. Nealon, A. Dakic, V. Simic, B.R. Haddad, J.S. Rhim, A. Dritschilo, A. Riegel, A. McBride, and R. Schlegel. 2012b. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology*. 180:599-607.
- Liu, Y., N. Pathak, A. Kramer-Zucker, and I.A. Drummond. 2007. Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development*. 134:1111-1122.
- Livraghi, A., and S.H. Randell. 2007. Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicologic pathology*. 35:116-129.
- Lize, M., C. Herr, A. Klimke, R. Bals, and M. Döbelstein. 2010a. MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia. *Cell cycle*. 9:4579-4583.
- Lize, M., S. Pilarski, and M. Döbelstein. 2010b. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell death and differentiation*. 17:452-458.
- Lodygin, D., V. Tarasov, A. Epanchintsev, C. Berking, T. Knyazeva, H. Korner, P. Knyazev, J. Diebold, and H. Hermeking. 2008. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell cycle*. 7:2591-2600.
- Loncarek, J., P. Hergert, V. Magidson, and A. Khodjakov. 2008. Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nature cell biology*. 10:322-328.

- Longphre, M., D. Li, M. Gallup, E. Drori, C.L. Ordonez, T. Redman, S. Wenzel, D.E. Bice, J.V. Fahy, and C. Basbaum. 1999. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 104:1375-1382.
- Lonnerdal, B., and S. Iyer. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual review of nutrition*. 15:93-110.
- Lou, Y.L., F. Guo, F. Liu, F.L. Gao, P.Q. Zhang, X. Niu, S.C. Guo, J.H. Yin, Y. Wang, and Z.F. Deng. 2012. miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia. *Molecular and cellular biochemistry*. 370:45-51.
- Lowe, J., and L.A. Amos. 2009. Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 41:323-329.
- Lu, J., J. Qian, F. Chen, X. Tang, C. Li, and W.V. Cardoso. 2005. Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 334:319-323.
- Lu, Y., J.M. Thomson, H.Y. Wong, S.M. Hammond, and B.L. Hogan. 2007. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Developmental biology*. 310:442-453.
- Luther, K.B., and R.S. Haltiwanger. 2009. Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:1011-1024.
- Macias, S., M. Plass, A. Stajuda, G. Michlewski, E. Eyra, and J.F. Caceres. 2012. DGCR8 HITS-CLIP reveals novel functions for the Microprocessor. *Nature structural & molecular biology*. 19:760-766.
- Malicki, J., A. Avanesov, J. Li, S. Yuan, and Z. Sun. 2011. Analysis of cilia structure and function in zebrafish. *Methods in cell biology*. 101:39-74.
- Mantile, G., L. Miele, E. Cordella-Miele, G. Singh, S.L. Katyal, and A.B. Mukherjee. 1993. Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *The Journal of biological chemistry*. 268:20343-20351.
- Marcet, B., and J.M. Boeynaems. 2006. Relationships between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, extracellular nucleotides and cystic fibrosis. *Pharmacology & therapeutics*. 112:719-732.
- Marcet, B., B. Chevalier, C. Coraux, L. Kodjabachian, and P. Barbry. 2011a. MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell cycle*. 10:2858-2864.
- Marcet, B., B. Chevalier, G. Luxardi, C. Coraux, L.E. Zaragosi, M. Cibois, K. Robbe-Sermesant, T. Jolly, B. Cardinaud, C. Moreilhon, L. Giovannini-Chami, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, R. Waldmann, L. Kodjabachian, and P. Barbry. 2011b. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology*. 13:693-699.
- Marcet, B., M. Horckmans, F. Libert, S. Hassid, J.M. Boeynaems, and D. Communi. 2007. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of cellular physiology*. 211:716-727.
- Mardh, P.A., L. Westrom, C. von Mecklenburg, and E. Hammar. 1976. Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. I. Swelling of the cilia of Fallopian tube epithelium in organ cultures infected with Mycoplasma hominis. *Br J Vener Dis*. 52:52-57.
- Marnellos, G., G.A. Deblandre, E. Mjolsness, and C. Kintner. 2000. Delta-Notch lateral inhibitory patterning in the emergence of ciliated cells in Xenopus: experimental observations and a gene network model. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*:329-340.
- Marshall, W.F. 2009. Centriole evolution. *Current opinion in cell biology*. 21:14-19.
- Martin, E., T. Ganz, and R.I. Lehrer. 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *Journal of leukocyte biology*. 58:128-136.
- Masterson, J.C., E.L. Molloy, J.L. Gilbert, N. McCormack, A. Adams, and S. O'Dea. 2011. Bone morphogenetic protein signalling in airway epithelial cells during regeneration. *Cellular signalling*. 23:398-406.

- Matthay, M.A., H.G. Folkesson, and A.S. Verkman. 1996. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *The American journal of physiology*. 270:L487-503.
- Matthay, M.A., L. Robriquet, and X. Fang. 2005. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc*. 2:206-213.
- Mazet, F., J.K. Yu, D.A. Liberles, L.Z. Holland, and S.M. Shimeld. 2003. Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene*. 316:79-89.
- Mazor, M., S. Alkrinawi, V. Chalifa-Caspi, E. Manor, V.C. Sheffield, M. Aviram, and R. Parvari. 2011. Primary ciliary dyskinesia caused by homozygous mutation in DNAL1, encoding dynein light chain 1. *American journal of human genetics*. 88:599-607.
- McBeath, R., D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell*. 6:483-495.
- McComb, P., L. Langley, M. Villalon, and P. Verdugo. 1986. The oviductal cilia and Kartagener's syndrome. *Fertil Steril*. 46:412-416.
- McCormack, N., E.L. Molloy, and S. O'Dea. 2013. Bone morphogenetic proteins enhance an epithelial-mesenchymal transition in normal airway epithelial cells during restitution of a disrupted epithelium. *Respir Res*. 14:36.
- McCormack, N., and S. O'Dea. 2013. Regulation of epithelial to mesenchymal transition by bone morphogenetic proteins. *Cellular signalling*.
- McDowell, E.M., L.A. Barrett, F. Glavin, C.C. Harris, and B.F. Trump. 1978. The respiratory epithelium. I. Human bronchus. *Journal of the National Cancer Institute*. 61:539-549.
- McDowell, E.M., J.W. Combs, and C. Newkirk. 1983. Changes in secretory cells of hamster tracheal epithelium in response to acute sublethal injury: a quantitative study. *Experimental lung research*. 4:227-243.
- McGill, M., D.P. Highfield, T.M. Monahan, and B.R. Brinkley. 1976. Effects of nucleic acid specific dyes on centrioles of mammalian cells. *Journal of ultrastructure research*. 57:43-53.
- McGrath, J., and M. Brueckner. 2003. Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Opin Genet Dev*. 13:385-392.
- McKiernan, P.J., O. Cunningham, C.M. Greene, and S.A. Cryan. 2013. Targeting miRNA-based medicines to cystic fibrosis airway epithelial cells using nanotechnology. *International journal of nanomedicine*. 8:3907-3915.
- McLaughlin, R.F., Jr., W.S. Tyler, and R.O. Canada. 1966. Subgross pulmonary anatomy of the rabbit, rat, and guinea pig, with additional notes on the human lung. *The American review of respiratory disease*. 94:380-387.
- Meijer, H.A., Y.W. Kong, W.T. Lu, A. Wilczynska, R.V. Spriggs, S.W. Robinson, J.D. Godfrey, A.E. Willis, and M. Bushell. 2013. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*. 340:82-85.
- Melrose, J., P. Ghosh, T.K. Taylor, and J.L. Andrews. 1992. The serine proteinase inhibitory proteins of the human intervertebral disc: their isolation, characterization and variation with ageing and degeneration. *Matrix*. 12:456-470.
- Mercer, R.R., M.L. Russell, V.L. Roggli, and J.D. Crapo. 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 10:613-624.
- Mercurio, A.R., and J.A. Rhodin. 1976. An electron microscopic study on the type I pneumocyte in the cat: differentiation. *The American journal of anatomy*. 146:255-271.
- Merveille, A.C., E.E. Davis, A. Becker-Heck, M. Legendre, I. Amirav, G. Bataille, J. Belmont, N. Beydon, F. Billen, A. Clement, C. Clercx, A. Coste, R. Crosbie, J. de Blic, S. Deleuze, P. Duquesnoy, D. Escalier, E. Escudier, M. Fliegauf, J. Horvath, K. Hill, M. Jorissen, J. Just, A. Kispert, M. Lathrop, N.T. Loges, J.K. Marthin, Y. Momozawa, G. Montantin, K.G. Nielsen, H. Olbrich, J.F. Papon, I. Rayet, G. Roger, M. Schmidts, H. Tenreiro, J.A. Towbin, D. Zelenika, H. Zentgraf, M. Georges, A.S. Lequarre, N. Katsanis, H. Omran, and S. Amselem. 2011. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nature genetics*. 43:72-78.

- Metz-Boutigue, M.H., J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, and P. Jolles. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem.* 145:659-676.
- Meyerholz, D.K., D.A. Stoltz, A.A. Pezzulo, and M.J. Welsh. 2010. Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *The American journal of pathology.* 176:1377-1389.
- Meyrick, B., and L. Reid. 1970. Ultrastructure of cells in the human bronchial submucosal glands. *J Anat.* 107:281-299.
- Meyrick, B., J.M. Sturgess, and L. Reid. 1969. A reconstruction of the duct system and secretory tubules of the human bronchial submucosal gland. *Thorax.* 24:729-736.
- Micchelli, C.A., E.J. Rulifson, and S.S. Blair. 1997. The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development.* 124:1485-1495.
- Miller, A.M., M. Masrourpour, C. Klaus, and J.X. Zhang. 2007a. LPS exacerbates endothelin-1 induced activation of cytosolic phospholipase A2 and thromboxane A2 production from Kupffer cells of the prefibrotic rat liver. *Journal of hepatology.* 46:276-285.
- Miller, T.L., B.N. Shashikant, A.L. Pilon, R.A. Pierce, T.H. Shaffer, and M.R. Wolfson. 2007b. Effects of recombinant Clara cell secretory protein (rhCC10) on inflammatory-related matrix metalloproteinase activity in a preterm lamb model of neonatal respiratory distress. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies.* 8:40-46.
- Mitchell, B., J.L. Stubbs, F. Huisman, P. Taborak, C. Yu, and C. Kintner. 2009. The PCP pathway instructs the planar orientation of ciliated cells in the *Xenopus* larval skin. *Current biology : CB.* 19:924-929.
- Mitchell, D.R. 2004. Speculations on the evolution of 9+2 organelles and the role of central pair microtubules. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 96:691-696.
- Mitchison, H.M., M. Schmidts, N.T. Loges, J. Freshour, A. Dritsoula, R.A. Hirst, C. O'Callaghan, H. Blau, M. Al Dabbagh, H. Olbrich, P.L. Beales, T. Yagi, H. Mussaffi, E.M. Chung, H. Omran, and D.R. Mitchell. 2012. Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nature genetics.* 44:381-389, S381-382.
- Mizutani, K., K. Yoon, L. Dang, A. Tokunaga, and N. Gaiano. 2007. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature.* 449:351-355.
- Molloy, E.L., A. Adams, J.B. Moore, J.C. Masterson, L. Madrigal-Estebas, B.P. Mahon, and S. O'Dea. 2008. BMP4 induces an epithelial-mesenchymal transition-like response in adult airway epithelial cells. *Growth factors.* 26:12-22.
- Moloney, D.J., V.M. Panin, S.H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K.D. Irvine, R.S. Haltiwanger, and T.F. Vogt. 2000a. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature.* 406:369-375.
- Moloney, D.J., L.H. Shair, F.M. Lu, J. Xia, R. Locke, K.L. Matta, and R.S. Haltiwanger. 2000b. Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *The Journal of biological chemistry.* 275:9604-9611.
- Moniaux, N., S. Nollet, N. Porchet, P. Degand, A. Laine, and J.P. Aubert. 1999. Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin. *The Biochemical journal.* 338 (Pt 2):325-333.
- Moore, D.J., A. Onoufriadis, A. Shoemark, M.A. Simpson, P.I. Zur Lage, S.C. de Castro, L. Bartoloni, G. Gallone, S. Petridi, W.J. Woollard, D. Antony, M. Schmidts, T. Didonna, P. Makrythanasis, J. Bevilard, N.P. Mongan, J. Djakow, G. Pals, J.S. Lucas, J.K. Marthin, K.G. Nielsen, F. Santoni, M. Guipponi, C. Hogg, S.E. Antonarakis, R.D. Emes, E.M. Chung, N.D. Greene, J.L. Blouin, A.P. Jarman, and H.M. Mitchison. 2013. Mutations in ZMYND10, a Gene Essential for Proper Axonemal Assembly of Inner and Outer Dynein Arms in Humans and Flies, Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *American journal of human genetics.*

- Mori, K., M. Amano, M. Takefuji, K. Kato, Y. Morita, T. Nishioka, Y. Matsuura, T. Murohara, and K. Kaibuchi. 2009. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *The Journal of biological chemistry*. 284:5067-5076.
- Moriarty, T.F., J.S. Elborn, and M.M. Tunney. 2007. Effect of pH on the antimicrobial susceptibility of planktonic and biofilm-grown clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *British journal of biomedical science*. 64:101-104.
- Moritz, M., M.B. Braunfeld, J.C. Fung, J.W. Sedat, B.M. Alberts, and D.A. Agard. 1995. Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *The Journal of cell biology*. 130:1149-1159.
- Morse, D.M., J.L. Smullen, and C.W. Davis. 2001. Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280:C1485-1497.
- Munger, B.L. 1958. A light and electron microscopic study of cellular differentiation in the pancreatic islets of the mouse. *The American journal of anatomy*. 103:275-311.
- Murakami, A., and R. Eckert. 1972. Cilia: activation coupled to mechanical stimulation by calcium influx. *Science*. 175:1375-1377.
- Murphy, C.J., B.A. Foster, M.J. Mannis, M.E. Selsted, and T.W. Reid. 1993. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 155:408-413.
- Nadel, J.A. 1985. Regulation of airway secretions. *Chest*. 87:111S-113S.
- Nakajima, M., O. Kawanami, E. Jin, M. Ghazizadeh, M. Honda, G. Asano, K. Horiba, and V.J. Ferrans. 1998. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathology international*. 48:944-953.
- Nakamura, F., T.P. Stossel, and J.H. Hartwig. 2011. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell adhesion & migration*. 5:160-169.
- Nakazawa, Y., M. Hiraki, R. Kamiya, and M. Hirano. 2007. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Current biology : CB*. 17:2169-2174.
- Navarro, A., R.M. Marrades, N. Vinolas, A. Quera, C. Agusti, A. Huerta, J. Ramirez, A. Torres, and M. Monzo. 2009. MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology*. 76:162-169.
- Navarro, J., M. Rainisio, H.K. Harms, M.E. Hodson, C. Koch, G. Mastella, B. Strandvik, and S.G. McKenzie. 2001. Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERF. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur Respir J*. 18:298-305.
- Neugebauer, J.M., J.D. Amack, A.G. Peterson, B.W. Bisgrove, and H.J. Yost. 2009. FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature*. 458:651-654.
- Newton, F.G., P.I. zur Lage, S. Karak, D.J. Moore, M.C. Gopfert, and A.P. Jarman. 2012. Forkhead transcription factor Fd3F cooperates with Rfx to regulate a gene expression program for mechanosensory cilia specialization. *Developmental cell*. 22:1221-1233.
- Nicastro, D., C. Schwartz, J. Pierson, R. Gaudette, M.E. Porter, and J.R. McIntosh. 2006. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science*. 313:944-948.
- Nilius, B., and G. Droogmans. 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta physiologica Scandinavica*. 177:119-147.
- Nonaka, S., H. Shiratori, Y. Saijoh, and H. Hamada. 2002. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*. 418:96-99.
- Nonaka, S., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido, and N. Hirokawa. 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*. 95:829-837.
- Noonan, E.J., R.F. Place, D. Pookot, S. Basak, J.M. Whitson, H. Hirata, C. Giardina, and R. Dahiya. 2009. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene*. 28:1714-1724.
- Norrander, J.M., R.W. Linck, and R.E. Stephens. 1995. Transcriptional control of tektin A mRNA correlates with cilia development and length determination during sea urchin embryogenesis. *Development*. 121:1615-1623.

- O'Brien, S.J., and C.M. Fraser. 2005. Genomes and evolution: the power of comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev.* 15:569-571.
- O'Connell, K.F., C. Caron, K.R. Kopish, D.D. Hurd, K.J. Kemphues, Y. Li, and J.G. White. 2001. The *C. elegans* *zyg-1* gene encodes a regulator of centrosome duplication with distinct maternal and paternal roles in the embryo. *Cell.* 105:547-558.
- O'Neill, S.J., E. Lesperance, and D.J. Klass. 1984. Human lung lavage surfactant enhances staphylococcal phagocytosis by alveolar macrophages. *The American review of respiratory disease.* 130:1177-1179.
- O'Toole, E., G. Greenan, K.I. Lange, M. Srayko, and T. Muller-Reichert. 2012. The role of gamma-tubulin in centrosomal microtubule organization. *PloS one.* 7:e29795.
- Oglesby, I.K., I.M. Bray, S.H. Chotirmall, R.L. Stallings, S.J. O'Neill, N.G. McElvaney, and C.M. Greene. 2010. miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol.* 184:1702-1709.
- Okada, C., E. Yamashita, S.J. Lee, S. Shibata, J. Katahira, A. Nakagawa, Y. Yoneda, and T. Tsukihara. 2009. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science.* 326:1275-1279.
- Okajima, T., A. Xu, and K.D. Irvine. 2003. Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *The Journal of biological chemistry.* 278:42340-42345.
- Okajima, T., A. Xu, L. Lei, and K.D. Irvine. 2005. Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science.* 307:1599-1603.
- Olbrich, H., K. Haffner, A. Kispert, A. Volkel, A. Volz, G. Sasmaz, R. Reinhardt, S. Hennig, H. Lehrach, N. Konietzko, M. Zariwala, P.G. Noone, M. Knowles, H.M. Mitchison, M. Meeks, E.M. Chung, F. Hildebrandt, R. Sudbrak, and H. Omran. 2002. Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nature genetics.* 30:143-144.
- Olsen, P.H., and V. Ambros. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology.* 216:671-680.
- Oppenheim, J.J., A. Biragyn, L.W. Kwak, and D. Yang. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the rheumatic diseases.* 62 Suppl 2:ii17-21.
- Ostedgaard, L.S., D.K. Meyerholz, J.H. Chen, A.A. Pezzulo, P.H. Karp, T. Rokhlina, S.E. Ernst, R.A. Hanfland, L.R. Reznikov, P.S. Ludwig, M.P. Rogan, G.J. Davis, C.L. Dohrn, C. Wohlford-Lenane, P.J. Taft, M.V. Rector, E. Hornick, B.S. Nassar, M. Samuel, Y. Zhang, S.S. Richter, A. Uc, J. Shilyansky, R.S. Prather, P.B. McCray, Jr., J. Zabner, M.J. Welsh, and D.A. Stoltz. 2011. The DeltaF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Science translational medicine.* 3:74ra24.
- Oteiza, P., M. Koppen, M.L. Concha, and C.P. Heisenberg. 2008. Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish. *Development.* 135:2807-2813.
- Pack, R.J., L.H. Al-Ugaily, G. Morris, and J.G. Widdicombe. 1980. The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell and tissue research.* 208:65-84.
- Paik, D.Y., D.M. Janzen, A.M. Schafenacker, V.S. Velasco, M.S. Shung, D. Cheng, J. Huang, O.N. Witte, and S. Memarzadeh. 2012. Stem-like epithelial cells are concentrated in the distal end of the fallopian tube: a site for injury and serous cancer initiation. *Stem Cells.* 30:2487-2497.
- Paisley, D., M. Gosling, and H. Danahay. 2010. Regulation of airway mucosal hydration. *Expert review of clinical pharmacology.* 3:361-369.
- Pan, J., Y. You, T. Huang, and S.L. Brody. 2007. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *Journal of cell science.* 120:1868-1876.
- Panizzi, J.R., A. Becker-Heck, V.H. Castleman, D.A. Al-Mutairi, Y. Liu, N.T. Loges, N. Pathak, C. Austin-Tse, E. Sheridan, M. Schmidts, H. Olbrich, C. Werner, K. Haffner, N. Hellman, R. Chodhari, A. Gupta, A. Kramer-Zucker, F. Olale, R.D. Burdine, A.F. Schier, C. O'Callaghan, E.M. Chung, R. Reinhardt, H.M. Mitchison, S.M. King, H. Omran, and I.A. Drummond. 2012. CCDC103

- mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nature genetics*. 44:714-719.
- Park, K.S., J.M. Wells, A.M. Zorn, S.E. Wert, V.E. Laubach, L.G. Fernandez, and J.A. Whitsett. 2006a. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34:151-157.
- Park, T.J., S.L. Haigo, and J.B. Wallingford. 2006b. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nature genetics*. 38:303-311.
- Park, T.J., B.J. Mitchell, P.B. Abitua, C. Kintner, and J.B. Wallingford. 2008. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature genetics*. 40:871-879.
- Pastor, L.M., A. Ferran, A. Calvo, C. Sprekelsen, R. Horn, and J.A. Marin. 1994. Morphological and histochemical study of human submucosal laryngeal glands. *The Anatomical record*. 239:453-467.
- Pathak, N., T. Obara, S. Mangos, Y. Liu, and I.A. Drummond. 2007. The zebrafish fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation. *Molecular biology of the cell*. 18:4353-4364.
- Pazour, G.J., N. Agrin, J. Leszyk, and G.B. Witman. 2005. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *The Journal of cell biology*. 170:103-113.
- Pedersen, L.B., and J.L. Rosenbaum. 2008. Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Current topics in developmental biology*. 85:23-61.
- Peel, N., N.R. Stevens, R. Basto, and J.W. Raff. 2007. Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation. *Current biology : CB*. 17:834-843.
- Perdomo, C., J.D. Campbell, J. Gerrein, C.S. Tellez, C.B. Garrison, T.C. Walser, E. Drizik, H. Si, A.C. Gower, J. Vick, C. Anderlind, G.R. Jackson, C. Mankus, F. Schembri, C. O'Hara, B.N. Gomperts, S.M. Dubinett, P. Hayden, S.A. Belinsky, M.E. Lenburg, and A. Spira. 2013. MicroRNA 4423 is a primate-specific regulator of airway epithelial cell differentiation and lung carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 112:535-548.
- Petcherski, A.G., and J. Kimble. 2000. Mastermind is a putative activator for Notch. *Current biology : CB*. 10:R471-473.
- Pezzulo, A.A., X.X. Tang, M.J. Hoegger, M.H. Alaiwa, S. Ramachandran, T.O. Moninger, P.H. Karp, C.L. Wohlford-Lenane, H.P. Haagsman, M. van Eijk, B. Banfi, A.R. Horswill, D.A. Stoltz, P.B. McCray, Jr., M.J. Welsh, and J. Zabner. 2012. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*. 487:109-113.
- Piasecki, B.P., J. Burghoorn, and P. Swoboda. 2010. Regulatory Factor X (RFX)-mediated transcriptional rewiring of ciliary genes in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:12969-12974.
- Pickett-Heaps, J. 1974. The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. *Biosystems*. 6:37-48.
- Pierucci-Alves, F., V. Akoyev, J.C. Stewart, 3rd, L.H. Wang, K.S. Janardhan, and B.D. Schultz. 2011. Swine models of cystic fibrosis reveal male reproductive tract phenotype at birth. *Biology of reproduction*. 85:442-451.
- Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 309:1573-1576.
- Piperno, G., B. Huang, and D.J. Luck. 1977. Two-dimensional analysis of flagellar proteins from wild-type and paralyzed mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74:1600-1604.
- Plopper, C.G. 1983. Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *The American review of respiratory disease*. 128:S37-41.

- Plopper, C.G., A.T. Mariassy, D.W. Wilson, J.L. Alley, S.J. Nishio, and P. Nettesheim. 1983. Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. *Experimental lung research*. 5:281-294.
- Pohl, B.S., and W. Knochel. 2004. Isolation and developmental expression of *Xenopus* FoxJ1 and FoxK1. *Dev Genes Evol*. 214:200-205.
- Polak, J.M., and S.R. Bloom. 1986. Regulatory peptides of the gastrointestinal and respiratory tracts. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 280:16-49.
- Popper, L., and D. Knorr. 1997. Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate-system. *Die Nahrung*. 41:29-33.
- Pottier, N., T. Maurin, B. Chevalier, M.P. Puissegur, K. Lebrigand, K. Robbe-Sermesant, T. Bertero, C.L. Lino Cardenas, E. Courcot, G. Rios, S. Fourre, J.M. Lo-Guidice, B. Marcet, B. Cardinaud, P. Barbry, and B. Mari. 2009. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PloS one*. 4:e6718.
- Pourtois, M., C. Binet, N. Van Tieghem, P. Courtois, A. Vandenabeele, and L. Thiry. 1990. Inhibition of HIV infectivity by lactoperoxidase-produced hypothiocyanite. *Journal de biologie buccale*. 18:251-253.
- Puchelle, E., D. Gaillard, D. Ploton, J. Hinnrasky, C. Fuchey, M.C. Boutterin, J. Jacquot, D. Dreyer, A. Pavirani, and W. Dalemans. 1992. Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 7:485-491.
- Puchelle, E., J.M. Zahm, and C. Duvivier. 1983. Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucous transport properties. *Biorheology*. 20:239-249.
- Puissegur, M.P., N.M. Mazure, T. Bertero, L. Pradelli, S. Grosso, K. Robbe-Sermesant, T. Maurin, K. Lebrigand, B. Cardinaud, V. Hofman, S. Fourre, V. Magnone, J.E. Ricci, J. Pouyssegur, P. Gounon, P. Hofman, P. Barbry, and B. Mari. 2011. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell death and differentiation*. 18:465-478.
- Puklowski, A., Y. Homsy, D. Keller, M. May, S. Chauhan, U. Kossatz, V. Grunwald, S. Kubicka, A. Pich, M.P. Manns, I. Hoffmann, P. Gonczy, and N.P. Malek. 2011. The SCF-FBXW5 E3-ubiquitin ligase is regulated by PLK4 and targets HsSAS-6 to control centrosome duplication. *Nature cell biology*. 13:1004-1009.
- Qi, X., T.G. Li, J. Hao, J. Hu, J. Wang, H. Simmons, S. Miura, Y. Mishina, and G.Q. Zhao. 2004. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:6027-6032.
- Quinton, P.M. 1981. Possible mechanisms of stimulus-induced vacuolation in serous cells of tracheal secretory glands. *The American journal of physiology*. 241:C25-32.
- Quinton, P.M. 1999. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*. 79:S3-S22.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology*. 265:23-32.
- Ramachandran, S., P.H. Karp, P. Jiang, L.S. Ostedgaard, A.E. Walz, J.T. Fisher, S. Keshavjee, K.A. Lennox, A.M. Jacobi, S.D. Rose, M.A. Behlke, M.J. Welsh, Y. Xing, and P.B. McCray, Jr. 2012. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:13362-13367.
- Randall, J., and C. Disbrey. 1965. Evidence for the presence of DNA at basal body sites in *Tetrahymena pyriformis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society. 162:473-491.

- Ratcliff, R., M.J. Evans, A.W. Cuthbert, L.J. MacVinish, D. Foster, J.R. Anderson, and W.H. Colledge. 1993. Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature genetics*. 4:35-41.
- Re'em-Kalma, Y., T. Lamb, and D. Frank. 1995. Competition between noggin and bone morphogenetic protein 4 activities may regulate dorsalization during *Xenopus* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:12141-12145.
- Reczek, D., M. Berryman, and A. Bretscher. 1997. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *The Journal of cell biology*. 139:169-179.
- Redeker, V., N. Levilliers, J.M. Schmitter, J.P. Le Caer, J. Rossier, A. Adoutte, and M.H. Bre. 1994. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*. 266:1688-1691.
- Redeker, V., N. Levilliers, E. Vinolo, J. Rossier, D. Jaillard, D. Burnette, J. Gaertig, and M.H. Bre. 2005. Mutations of tubulin glycylation sites reveal cross-talk between the C termini of alpha- and beta-tubulin and affect the ciliary matrix in *Tetrahymena*. *The Journal of biological chemistry*. 280:596-606.
- Redeker, V., R. Melki, D. Prome, J.P. Le Caer, and J. Rossier. 1992. Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated. *FEBS letters*. 313:185-192.
- Reibman, J., Y. Hsu, L.C. Chen, B. Bleck, and T. Gordon. 2003. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 28:648-654.
- Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, and G. Ruvkun. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-906.
- Reiter, J.F., O.E. Blacque, and M.R. Leroux. 2012. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO reports*. 13:608-618.
- Reynolds, S.D., K.U. Hong, A. Giangreco, G.W. Mango, C. Guron, Y. Morimoto, and B.R. Stripp. 2000. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 278:L1256-1263.
- Reynolds, S.D., P.R. Reynolds, G.S. Pryhuber, J.D. Finder, and B.R. Stripp. 2002. Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 166:1498-1509.
- Rhodin, J.A. 1966. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *The American review of respiratory disease*. 93:Suppl:1-15.
- Rimoldi, M., M. Chieppa, P. Larghi, M. Vulcano, P. Allavena, and M. Rescigno. 2005. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood*. 106:2818-2826.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, and et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245:1066-1073.
- Rock, J.R., X. Gao, Y. Xue, S.H. Randell, Y.Y. Kong, and B.L. Hogan. 2011. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 8:639-648.
- Rock, J.R., M.W. Onaitis, E.L. Rawlins, Y. Lu, C.P. Clark, Y. Xue, S.H. Randell, and B.L. Hogan. 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:12771-12775.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst, and A. Bradley. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*. 14:1902-1910.
- Rogers, A.V., A. Dewar, B. Corrin, and P.K. Jeffery. 1993. Identification of serous-like cells in the surface epithelium of human bronchioles. *Eur Respir J*. 6:498-504.

- Rogers, C.S., Y. Hao, T. Rokhlina, M. Samuel, D.A. Stoltz, Y. Li, E. Petroff, D.W. Vermeer, A.C. Kabel, Z. Yan, L. Spate, D. Wax, C.N. Murphy, A. Rieke, K. Whitworth, M.L. Linville, S.W. Korte, J.F. Engelhardt, M.J. Welsh, and R.S. Prather. 2008a. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *The Journal of clinical investigation*. 118:1571-1577.
- Rogers, C.S., D.A. Stoltz, D.K. Meyerholz, L.S. Ostedgaard, T. Rokhlina, P.J. Taft, M.P. Rogan, A.A. Pezzulo, P.H. Karp, O.A. Itani, A.C. Kabel, C.L. Wohlford-Lenane, G.J. Davis, R.A. Hanfland, T.L. Smith, M. Samuel, D. Wax, C.N. Murphy, A. Rieke, K. Whitworth, A. Uc, T.D. Starner, K.A. Brogden, J. Shilyansky, P.B. McCray, Jr., J. Zabner, R.S. Prather, and M.J. Welsh. 2008b. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. 321:1837-1841.
- Rogers, D.F. 1994. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *Eur Respir J*. 7:1690-1706.
- Rogers, D.F. 2003a. Airway hypersecretion in allergic rhinitis and asthma: new pharmacotherapy. *Current allergy and asthma reports*. 3:238-248.
- Rogers, D.F. 2003b. Pulmonary mucus: Pediatric perspective. *Pediatric pulmonology*. 36:178-188.
- Rogowski, K., F. Juge, J. van Dijk, D. Wloga, J.M. Strub, N. Levilliers, D. Thomas, M.H. Bre, A. Van Dorsselaer, J. Gaertig, and C. Janke. 2009. Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell*. 137:1076-1087.
- Rosenbaum, J.L., D.G. Cole, and D.R. Diener. 1999. Intraflagellar transport: the eyes have it. *The Journal of cell biology*. 144:385-388.
- Ross, A.J., L.A. Dailey, L.E. Brighton, and R.B. Devlin. 2007. Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 37:169-185.
- Rougvie, A.E. 2001. Control of developmental timing in animals. *Nature reviews. Genetics*. 2:690-701.
- Roux, J. 2010. Régénération et remodelage de l'épithélium bronchique humain normal et mucoviscidose. In U.F.R. DE MEDECINE UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE.
- Rozmahel, R., M. Wilschanski, A. Matin, S. Plyte, M. Oliver, W. Auerbach, A. Moore, J. Forstner, P. Durie, J. Nadeau, C. Bear, and L.C. Tsui. 1996. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nature genetics*. 12:280-287.
- Rutland, J., W.M. Griffin, and P.J. Cole. 1982. Human ciliary beat frequency in epithelium from intrathoracic and extrathoracic airways. *The American review of respiratory disease*. 125:100-105.
- Sakaki-Yumoto, M., J. Liu, M. Ramalho-Santos, N. Yoshida, and R. Derynck. 2013. Smad2 is essential for maintenance of the human and mouse primed pluripotent stem cell state. *The Journal of biological chemistry*. 288:18546-18560.
- Sanchez Freire, V., F.C. Burkhard, T.M. Kessler, A. Kuhn, A. Draeger, and K. Monastyrskaya. 2010. MicroRNAs may mediate the down-regulation of neurokinin-1 receptor in chronic bladder pain syndrome. *The American journal of pathology*. 176:288-303.
- Sanderson, M.J., and E.R. Dirksen. 1985. A versatile and quantitative computer-assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell motility*. 5:267-292.
- Sanderson, M.J., and M.A. Sleight. 1981. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *Journal of cell science*. 47:331-347.
- Sandoz, D., B. Chailley, E. Boisvieux-Ulrich, M. Lemullois, M.C. Laine, and G. Bautista-Harris. 1988. Organization and functions of cytoskeleton in metazoan ciliated cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 63:183-193.
- Saotome, I., M. Curto, and A.I. McClatchey. 2004. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Developmental cell*. 6:855-864.
- Satir, P., and S.T. Christensen. 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology*. 69:377-400.
- Satir, P., D.R. Mitchell, and G. Jekely. 2008. How did the cilium evolve? *Curr Top Dev Biol*. 85:63-82.

- Sawamoto, K., H. Wichterle, O. Gonzalez-Perez, J.A. Cholfín, M. Yamada, N. Spassky, N.S. Murcia, J.M. Garcia-Verdugo, O. Marin, J.L. Rubenstein, M. Tessier-Lavigne, H. Okano, and A. Alvarez-Buylla. 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 311:629-632.
- Schmidt, L.M., M.G. Belvisi, K.A. Bode, J. Bauer, C. Schmidt, M.T. Suchy, D. Tsikas, J. Scheuerer, F. Lasitschka, H.J. Grone, and A.H. Dalpke. 2011. Bronchial epithelial cell-derived prostaglandin E2 dampens the reactivity of dendritic cells. *J Immunol*. 186:2095-2105.
- Schmidt, T.I., J. Kleylein-Sohn, J. Westendorf, M. Le Clech, S.B. Lavoie, Y.D. Stierhof, and E.A. Nigg. 2009. Control of centriole length by CPAP and CP110. *Current biology : CB*. 19:1005-1011.
- Schockel, L., M. Mockel, B. Mayer, D. Boos, and O. Stemmann. 2011. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nature cell biology*. 13:966-972.
- Schutysse, E., S. Struyf, and J. Van Damme. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & growth factor reviews*. 14:409-426.
- Schwarz, M.A., K. Owaribe, J. Kartenbeck, and W.W. Franke. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annual review of cell biology*. 6:461-491.
- Schweickert, A., T. Weber, T. Beyer, P. Vick, S. Bogusch, K. Feistel, and M. Blum. 2007. Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Current biology : CB*. 17:60-66.
- Seeley, E.S., and M.V. Nachury. 2010. The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *Journal of cell science*. 123:511-518.
- Selbach, M., B. Schwanhauss, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 455:58-63.
- Serafini, S.M., and E.D. Michaelson. 1977. Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 13:551-559.
- Shapiro, L., and W.I. Weis. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a003053.
- Sharp, J.A., J.J. Plant, T.K. Ohsumi, M. Borowsky, and M.D. Blower. 2011. Functional analysis of the microtubule-interacting transcriptome. *Molecular biology of the cell*. 22:4312-4323.
- Shebani, E., S. Shahana, C. Janson, G.M. Roomans, and B.H.R. group. 2005. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue & cell*. 37:145-152.
- Sheehan, J.K., M. Howard, P.S. Richardson, T. Longwill, and D.J. Thornton. 1999. Physical characterization of a low-charge glycoform of the MUC5B mucin comprising the gel-phase of an asthmatic respiratory mucous plug. *The Biochemical journal*. 338 (Pt 2):507-513.
- Shen, B.Q., R.J. Mistry, W.E. Finkbeiner, and J.H. Widdicombe. 1995. Role of CFTR in chloride secretion across human tracheal epithelium. *The American journal of physiology*. 269:L561-566.
- Shen, L., and J.R. Turner. 2005. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell*. 16:3919-3936.
- Shenolikar, S., and E.J. Weinman. 2001. NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *American journal of physiology. Renal physiology*. 280:F389-395.
- Shim, J.J., K. Dabbagh, I.F. Ueki, T. Dao-Pick, P.R. Burgel, K. Takeyama, D.C. Tam, and J.A. Nadel. 2001. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 280:L134-140.
- Shimada, Y., S. Yonemura, H. Ohkura, D. Strutt, and T. Uemura. 2006. Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. *Developmental cell*. 10:209-222.
- Shuangshoti, S., P. Paisantornsook, and M.G. Netsky. 1979. Melanosis of the choroid plexus, ependyma, subependymal neuroglia, and dentate and trigeminal motor nuclei: observations on the choroidal and ependymal cilia. *Arch Pathol Lab Med*. 103:112-115.
- Silverman, M.A., and M.R. Leroux. 2009. Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia. *Trends in cell biology*. 19:306-316.

- Simpson, P. 1990. Notch and the choice of cell fate in *Drosophila* neuroepithelium. *Trends in genetics* : *TIG*. 6:343-345.
- Singh, G., and S.L. Katyal. 1997. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 17:141-143.
- Singh, G., and S.L. Katyal. 2000. Clara cell proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 923:43-58.
- Singh, P.K., H.P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B.A. Conway, E.P. Greenberg, E.V. Valore, M.J. Welsh, T. Ganz, B.F. Tack, and P.B. McCray, Jr. 1998. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:14961-14966.
- Sleigh, M.A. 1981. Ciliary function in mucus transport. *Chest*. 80:791-795.
- Snouwaert, J.N., K.K. Brigman, A.M. Latour, N.N. Malouf, R.C. Boucher, O. Smithies, and B.H. Koller. 1992. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science*. 257:1083-1088.
- Snow, J.J., G. Ou, A.L. Gunnarson, M.R. Walker, H.M. Zhou, I. Brust-Mascher, and J.M. Scholey. 2004. Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons. *Nature cell biology*. 6:1109-1113.
- Solberg, O.D., E.J. Ostrin, M.I. Love, J.C. Peng, N.R. Bhakta, L. Hou, C. Nguyen, M. Solon, C. Nguyen, A.J. Barczak, L.T. Zlock, D.P. Blagev, W.E. Finkbeiner, K.M. Ansel, J.R. Arron, D.J. Erle, and P.G. Woodruff. 2012. Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 186:965-974.
- Sorokin, S.P. 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *Journal of cell science*. 3:207-230.
- Sountoulidis, A., A. Stavropoulos, S. Giaglis, E. Apostolou, R. Monteiro, S.M. Chuva de Sousa Lopes, H. Chen, B.R. Stripp, C. Mummery, E. Andreakos, and P. Sideras. 2012. Activation of the canonical bone morphogenetic protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair. *PloS one*. 7:e41460.
- Spektor, A., W.Y. Tsang, D. Khoo, and B.D. Dynlacht. 2007. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell*. 130:678-690.
- Spicer, S.S., I. Mochizuki, M.E. Setser, and J.R. Martinez. 1980. Complex carbohydrates of rat tracheobronchial surface epithelium visualized ultrastructurally. *The American journal of anatomy*. 158:93-109.
- Springer, J., D. Pleimes, F.R. Scholz, and A. Fischer. 2005. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species. *Regulatory peptides*. 124:99-103.
- Starner, T.D., C.K. Barker, H.P. Jia, Y. Kang, and P.B. McCray, Jr. 2003. CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29:627-633.
- Stepp, M.A., S. Spurr-Michaud, A. Tisdale, J. Elwell, and I.K. Gipson. 1990. Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:8970-8974.
- Stick, S.M., and P.G. Holt. 2003. The airway epithelium as immune modulator: the LARC ascending. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 28:641-644.
- Stolc, V., M.P. Samanta, W. Tongprasit, and W.F. Marshall. 2005. Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:3703-3707.
- Stripp, B.R., and S.D. Reynolds. 2008. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc*. 5:328-333.
- Stripp, B.R., S.D. Reynolds, C.G. Plopper, I.M. Boe, and J. Lund. 2000. Pulmonary phenotype of CCSP/UG deficient mice: a consequence of CCSP deficiency or altered Clara cell function? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 923:202-209.
- Strnad, P., and P. Gonczy. 2008. Mechanisms of procentriole formation. *Trends in cell biology*. 18:389-396.

- Stubbs, J.L., L. Davidson, R. Keller, and C. Kintner. 2006. Radial intercalation of ciliated cells during *Xenopus* skin development. *Development*. 133:2507-2515.
- Stubbs, J.L., I. Oishi, J.C. Izpisua Belmonte, and C. Kintner. 2008. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nature genetics*. 40:1454-1460.
- Stubbs, J.L., E.K. Vladar, J.D. Axelrod, and C. Kintner. 2012. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nature cell biology*. 14:140-147.
- Sui, H., and K.H. Downing. 2006. Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography. *Nature*. 442:475-478.
- Sundaram, G.M., J.E. Common, F.E. Gopal, S. Srikantha, K. Lakshman, D.P. Lunny, T.C. Lim, V. Tanavde, E.B. Lane, and P. Sampath. 2013. 'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing. *Nature*. 495:103-106.
- Sunday, M.E., J. Hua, H.B. Dai, A. Nusrat, and J.S. Torday. 1990. Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 3:199-205.
- Supryniewicz, F.A., G. Upadhyay, E. Krawczyk, S.C. Kramer, J.D. Hebert, X. Liu, H. Yuan, C. Cheluvvaraju, P.W. Clapp, R.C. Boucher, Jr., C.M. Kamonjoh, S.H. Randell, and R. Schlegel. 2012. Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:20035-20040.
- Suryavanshi, S., B. Edde, L.A. Fox, S. Guerrero, R. Hard, T. Hennessey, A. Kabi, D. Malison, D. Pennock, W.S. Sale, D. Wloga, and J. Gaertig. 2010. Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Current biology : CB*. 20:435-440.
- Symons, M., and N. Rusk. 2003. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Current biology : CB*. 13:R409-418.
- Tafel, O., P. Latzin, K. Paul, T. Winter, M. Woischnik, and M. Griesse. 2008. Surfactant proteins SP-B and SP-C and their precursors in bronchoalveolar lavages from children with acute and chronic inflammatory airway disease. *BMC pulmonary medicine*. 8:6.
- Tan, F.E., E.K. Vladar, L. Ma, L.C. Fuentealba, R. Hoh, F.H. Espinoza, J.D. Axelrod, A. Alvarez-Buylla, T. Stearns, C. Kintner, and M.A. Krasnow. 2013. Myb promotes centriole amplification and later steps of the multiciliogenesis program. *Development*. 140:4277-4286.
- Tang, C.J., R.H. Fu, K.S. Wu, W.B. Hsu, and T.K. Tang. 2009. CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nature cell biology*. 11:825-831.
- Tang, T., S. Kumar, Y. Shen, J. Lu, M.L. Wu, S. Shi, W.H. Li, and C.I. Wu. 2010. Adverse interactions between micro-RNAs and target genes from different species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:12935-12940.
- Tarasov, V., P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister, and H. Hermeking. 2007. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell cycle*. 6:1586-1593.
- Tarran, R. 2004. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc*. 1:42-46.
- Tarran, R., B.R. Grubb, J.T. Gatzky, C.W. Davis, and R.C. Boucher. 2001. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *The Journal of general physiology*. 118:223-236.
- Tenovuo, J., S. Hannuksela, and M. Lenander-Lumikari. 1995. Effects of delmopinol on antimicrobial peroxidase systems and lysozyme in vitro and in human whole saliva. *European journal of oral sciences*. 103:247-252.
- Tesfaigzi, Y., M.J. Fischer, A.J. Martin, and J. Seagrave. 2000. Bcl-2 in LPS- and allergen-induced hyperplastic mucous cells in airway epithelia of Brown Norway rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 279:L1210-1217.
- Thornton, D.J., K. Rousseau, and M.A. McGuckin. 2008. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annual review of physiology*. 70:459-486.

- Thornton, D.J., and J.K. Sheehan. 2004. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc.* 1:54-61.
- Tiddens, H., M. Silverman, and A. Bush. 2000. The role of inflammation in airway disease: remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 162:S7-S10.
- Tobin, J.L., and P.L. Beales. 2009. The nonmotile ciliopathies. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 11:386-402.
- Tos, M. 1966. Development of the tracheal glands in man. Number, density, structure, shape, and distribution of mucous glands elucidated by quantitative studies of whole mounts. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica.* 68:Suppl 185:183+.
- Toskala, E., S.M. Smiley-Jewell, V.J. Wong, D. King, and C.G. Plopper. 2005. Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 289:L454-459.
- Trinh, N.T., O. Bardou, A. Prive, E. Maille, D. Adam, S. Lingee, P. Ferraro, M.Y. Desrosiers, C. Coraux, and E. Brochiero. 2012. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J.* 40:1390-1400.
- Trinh, N.T., A. Prive, L. Kheir, J.C. Bourret, T. Hijazi, M.G. Amraei, J. Noel, and E. Brochiero. 2007. Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 293:L870-882.
- Tsao, P.N., M. Vasconcelos, K.I. Izvolsky, J. Qian, J. Lu, and W.V. Cardoso. 2009. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development.* 136:2297-2307.
- Tsujikawa, M., and J. Malicki. 2004. Genetics of photoreceptor development and function in zebrafish. *Int J Dev Biol.* 48:925-934.
- Tsuruta, D., S.B. Hopkinson, and J.C. Jones. 2003. Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells. *Cell motility and the cytoskeleton.* 54:122-134.
- Turner, J., J. Roger, J. Fitau, D. Combe, J. Giddings, G.V. Heeke, and C.E. Jones. 2011. Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 44:276-284.
- Tyner, J.W., E.Y. Kim, K. Ide, M.R. Pelletier, W.T. Roswit, J.D. Morton, J.T. Battaile, A.C. Patel, G.A. Patterson, M. Castro, M.S. Spoor, Y. You, S.L. Brody, and M.J. Holtzman. 2006. Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *The Journal of clinical investigation.* 116:309-321.
- Upham, J.W., and S.M. Stick. 2006. Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Current drug targets.* 7:541-545.
- Urist, M.R. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150:893-899.
- Ussing, H.H., and K. Zerahn. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta physiologica Scandinavica.* 23:110-127.
- Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler. 2012. The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal.* 31:2714-2736.
- Vallyathan, V., X.L. Shi, N.S. Dalal, W. Irr, and V. Castranova. 1988. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *The American review of respiratory disease.* 138:1213-1219.
- van Breugel, M., M. Hirono, A. Andreeva, H.A. Yanagisawa, S. Yamaguchi, Y. Nakazawa, N. Morgner, M. Petrovich, I.O. Ebong, C.V. Robinson, C.M. Johnson, D. Veprintsev, and B. Zuber. 2011. Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles. *Science.* 331:1196-1199.
- Van Klinken, B.J., H.A. Buller, A.W. Einerhand, and J. Dekker. 2000. Identification of mucins using metabolic labeling, immunoprecipitation, and gel electrophoresis. *Methods in molecular biology.* 125:239-247.
- van Klinken, B.J., A.W. Einerhand, H.A. Buller, and J. Dekker. 1998. The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins. *Glycobiology.* 8:67-75.

- Van Scott, M.R., S. Hester, and R.C. Boucher. 1987. Ion transport by rabbit nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:5496-5500.
- Varsano, S., C.B. Basbaum, L.S. Forsberg, D.B. Borson, G. Caughey, and J.A. Nadel. 1987. Dog tracheal epithelial cells in culture synthesize sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases. *Experimental lung research*. 13:157-184.
- Verdugo, P. 1990. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annual review of physiology*. 52:157-176.
- Vij, S., J.C. Rink, H.K. Ho, D. Babu, M. Eitel, V. Narasimhan, V. Tikku, J. Westbrook, B. Schierwater, and S. Roy. 2012. Evolutionarily ancient association of the FoxJ1 transcription factor with the motile ciliogenic program. *PLoS Genet*. 8:e1003019.
- Vinther, J., M.M. Hedegaard, P.P. Gardner, J.S. Andersen, and P. Arctander. 2006. Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Nucleic acids research*. 34:e107.
- Vize, P.D., E.A. Jones, and R. Pfister. 1995. Development of the *Xenopus* pronephric system. *Developmental biology*. 171:531-540.
- Vladar, E.K., and J.D. Axelrod. 2008. Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends in cell biology*. 18:517-520.
- Vladar, E.K., R.D. Bayly, A.M. Sangoram, M.P. Scott, and J.D. Axelrod. 2012. Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Current biology : CB*. 22:2203-2212.
- Vogel, P., G. Hansen, G. Fontenot, and R. Read. 2010. Tubulin tyrosine ligase-like 1 deficiency results in chronic rhinosinusitis and abnormal development of spermatid flagella in mice. *Veterinary pathology*. 47:703-712.
- Voilley, N., A. Galibert, F. Bassilana, S. Renard, E. Lingueglia, S. Coscoy, G. Champigny, P. Hofman, M. Lazdunski, and P. Barbry. 1997. The amiloride-sensitive Na⁺ channel: from primary structure to function. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology*. 118:193-200.
- Voynow, J.A., B.M. Fischer, B.C. Roberts, and A.D. Proia. 2005. Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 172:1013-1018.
- Wallingford, J.B. 2010. Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Current opinion in cell biology*. 22:597-604.
- Wang, H.W., C. Noland, B. Siridechadilok, D.W. Taylor, E. Ma, K. Felderer, J.A. Doudna, and E. Nogales. 2009a. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature structural & molecular biology*. 16:1148-1153.
- Wang, L., C. Fu, H. Fan, T. Du, M. Dong, Y. Chen, Y. Jin, Y. Zhou, M. Deng, A. Gu, Q. Jing, T. Liu, and Y. Zhou. 2013. miR-34b regulates multiciliogenesis during organ formation in zebrafish. *Development*. 140:2755-2764.
- Wang, Y., V. Brahmakshatriya, H. Zhu, B. Lupiani, S.M. Reddy, B.J. Yoon, P.H. Gunaratne, J.H. Kim, R. Chen, J. Wang, and H. Zhou. 2009b. Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach. *BMC genomics*. 10:512.
- Wanner, A., M. Salathe, and T.G. O'Riordan. 1996. Mucociliary clearance in the airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 154:1868-1902.
- Warburton, D., and S. Bellusci. 2004. The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatric respiratory reviews*. 5 Suppl A:S283-287.
- Warburton, D., C. Wuenschell, G. Flores-Delgado, and K. Anderson. 1998. Commitment and differentiation of lung cell lineages. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 76:971-995.
- Warner, F.D., and P. Satir. 1973. The substructure of ciliary microtubules. *Journal of cell science*. 12:313-326.
- Waters, A.M., and P.L. Beales. 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatric nephrology*. 26:1039-1056.

- Watson, T.M., S.D. Reynolds, G.W. Mango, I.M. Boe, J. Lund, and B.R. Stripp. 2001. Altered lung gene expression in CCSP-null mice suggests immunoregulatory roles for Clara cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 281:L1523-1530.
- Weaver, M., J.M. Yingling, N.R. Dunn, S. Bellusci, and B.L. Hogan. 1999. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development*. 126:4005-4015.
- Weichselbaum, M., M.P. Sparrow, E.J. Hamilton, P.J. Thompson, and D.A. Knight. 2005. A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. *Respir Res*. 6:115.
- Welsh, M.J., and J.J. Smith. 2001. cAMP stimulation of HCO₃⁻ secretion across airway epithelia. *JOP : Journal of the pancreas*. 2:291-293.
- Werner, M.E., P. Hwang, F. Huisman, P. Taborek, C.C. Yu, and B.J. Mitchell. 2011. Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *The Journal of cell biology*. 195:19-26.
- Werner, M.E., and B.J. Mitchell. 2012. Understanding ciliated epithelia: the power of *Xenopus*. *Genesis*. 50:176-185.
- Werner, M.E., and B.J. Mitchell. 2013. Using *Xenopus* skin to study cilia development and function. *Methods in enzymology*. 525:191-217.
- Wessely, O., and U. Tran. 2011. *Xenopus* pronephros development--past, present, and future. *Pediatric nephrology*. 26:1545-1551.
- Westrom, L., P.A. Mardh, C.V. Mecklenburg, and C.H. Hakansson. 1977. Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. II. The mucociliary wave pattern of fallopian tube epithelium. *Fertil Steril*. 28:955-961.
- Wharton, J., J.M. Polak, S.R. Bloom, M.A. Ghatei, E. Solcia, M.R. Brown, and A.G. Pearse. 1978a. Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature*. 273:769-770.
- Wharton, J., J.M. Polak, M.A. Ghatei, S.R. Bloom, and A.G. Pearse. 1978b. The presence of bombesin, a recently discovered gut and brain peptide, in human lung [proceedings]. *The Journal of endocrinology*. 77:44P-45P.
- Wheatley, D.N., A.M. Wang, and G.E. Strugnell. 1996. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int*. 20:73-81.
- Whitfield, T.T., M. Granato, F.J. van Eeden, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, D.A. Kane, R.N. Kelsh, M.C. Mullins, J. Odenthal, and C. Nusslein-Volhard. 1996. Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development*. 123:241-254.
- Wickstrom, C., J.R. Davies, G.V. Eriksen, E.C. Veerman, and I. Carlstedt. 1998. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *The Biochemical journal*. 334 (Pt 3):685-693.
- Widdicombe, J.G., and R.J. Pack. 1982. The Clara cell. *European journal of respiratory diseases*. 63:202-220.
- Widdicombe, J.H., S.J. Bastacky, D.X. Wu, and C.Y. Lee. 1997. Regulation of depth and composition of airway surface liquid. *Eur Respir J*. 10:2892-2897.
- Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75:855-862.
- Wijkstrom-Frei, C., S. El-Chemaly, R. Ali-Rachedi, C. Gerson, M.A. Cobas, R. Forteza, M. Salathe, and G.E. Conner. 2003. Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29:206-212.
- Willecke, K., J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch, and G. Sohl. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological chemistry*. 383:725-737.
- Willems, L.N., J.A. Kramps, P.K. Jeffery, and J.H. Dijkman. 1988. Antileucoprotease in the developing fetal lung. *Thorax*. 43:784-786.

- Williams, A.E., M.M. Perry, S.A. Moschos, and M.A. Lindsay. 2007. microRNA expression in the aging mouse lung. *BMC genomics*. 8:172.
- Williams, S.J., D.J. Munster, R.J. Quin, D.C. Gotley, and M.A. McGuckin. 1999. The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. *Biochemical and biophysical research communications*. 261:83-89.
- Williams, S.J., D.H. Wreschner, M. Tran, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, and M.A. McGuckin. 2001. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *The Journal of biological chemistry*. 276:18327-18336.
- Witman, G.B., J. Plummer, and G. Sander. 1978. Chlamydomonas flagellar mutants lacking radial spokes and central tubules. Structure, composition, and function of specific axonemal components. *The Journal of cell biology*. 76:729-747.
- Wloga, D., D.M. Webster, K. Rogowski, M.-H. Bré, N. Levilliers, M. Jerka-Dziadosz, C. Janke, S.T. Dougan, and J. Gaertig. 2009. TTL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia. *Developmental cell*. 16:867-876.
- Won, K.Y., Y.W. Kim, H.S. Kim, S.K. Lee, W.W. Jung, and Y.K. Park. 2013. MicroRNA-199b-5p is involved in the Notch signaling pathway in osteosarcoma. *Human pathology*. 44:1648-1655.
- Wu, L., J.C. Aster, S.C. Blacklow, R. Lake, S. Artavanis-Tsakonas, and J.D. Griffin. 2000. MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nature genetics*. 26:484-489.
- Wu, W., Z. Lin, Z. Zhuang, and X. Liang. 2009. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*. 18:50-55.
- Wu, Z., Y. Wu, Y. Tian, X. Sun, J. Liu, H. Ren, C. Liang, L. Song, H. Hu, L. Wang, and B. Jiao. 2013. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells. *Oncology letters*. 6:1447-1452.
- Yaragatti, M., C. Basilico, and L. Dailey. 2008. Identification of active transcriptional regulatory modules by the functional assay of DNA from nucleosome-free regions. *Genome research*. 18:930-938.
- Yeo, C., and M. Whitman. 2001. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Molecular cell*. 7:949-957.
- Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara, and B.R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 17:3011-3016.
- You, Y., T. Huang, E.J. Richer, J.E. Schmidt, J. Zabner, Z. Borok, and S.L. Brody. 2004. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286:L650-657.
- Yu, J.Y., K.H. Chung, M. Deo, R.C. Thompson, and D.L. Turner. 2008a. MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Experimental cell research*. 314:2618-2633.
- Yu, X., C.P. Ng, H. Habacher, and S. Roy. 2008b. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nature genetics*. 40:1445-1453.
- Zahm, J.M., D. Pierrot, J. Hinnrasky, C. Fuchey, M. Chevillard, D. Gaillard, and E. Puchelle. 1990. Functional activity of ciliated outgrowths from cultured human nasal and tracheal epithelia. *Biorheology*. 27:559-565.
- Zauli, G., R. Voltan, M.G. di lasio, R. Bosco, E. Melloni, M.E. Sana, and P. Secchiero. 2011. miR-34a induces the downregulation of both E2F1 and B-Myb oncogenes in leukemic cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17:2712-2724.
- Zeng, Y., and B.R. Cullen. 2004. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research*. 32:4776-4785.